

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



| | | |
|--|-----------|--|
| (51) Clasificación Internacional de Patentes 6 : C12N 15/86, 7/01, A61K 39/225, 39/215, 35/76 | A1 | (11) Número de publicación internacional: WO 97/34008 (43) Fecha de publicación internacional: 18 de Septiembre de 1997 (18.09.97) |
|--|-----------|--|

(21) Solicitud internacional: PCT/ES97/00059

(22) Fecha de la presentación internacional:
12 de Marzo de 1997 (12.03.97)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9600620 14 de Marzo de 1996 ES
(14.03.96)

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CYANAMID IBERICA, S.A. [ES/ES]; Cristobal Bordiu, 35, E-28003 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): ENJUANES SANCHEZ, Luis [ES/ES]; Calle Camino Nuevo, 113, E-28100 Alcobendas (ES). PLANA DURAN, Juan [ES/ES]; Carretera Camprodón, "La Riba", E-17813 Vall De Bianya, Olot (ES). ALONSO VILLANUEVA, Sara [ES/ES]; Autónomo, 62, 3º, E-48012 Bilbao (ES). BALLESTEROS JARREÑO, Mª Luisa [ES/ES]; Calle Sánchez Vera, 7, 3º B, E-16002 Cuenca (ES). CASTILLA CASTRILLON, Joaquin [ES/ES]; Marqués de la Valdavia, 94, Escalera 2, 4º A, E-28100 Alcobendas (ES). GONZALEZ MARTINEZ, José Manuel [ES/ES]; Vicente Medina, 28, Miranda, E-30319 Cartagena (ES). IZETA PARMESAN, Ander [ES/ES]; Pº de los

Arbustos, 18, 5º, E-20009 San Sebastian (ES). MENDEZ ZUNZUNEGUI, Ana [ES/ES]; Gran Vía, 170, E-36210 Vigo (ES). MUNTION SAENZ, María [ES/ES]; Avenida Pamplona, 25, 6º B, E-31010 Pamplona (ES). PENZES, Zoltan [HU/ES]; Isla de Ons, 6, 4º, E-28035 Madrid (ES). SANCHEZ MORGADO, José Manuel [ES/ES]; Avenida Portugal, 62, 3º, E-28933 Mostoles (ES). SANCHEZ SANCHEZ, Carlos Miguel [ES/ES]; Calle Villajoyosa, 94, Bajo F, E-28041 Madrid (ES). SMERDOU PICAZO, Cristian [ES/ES]; Avenida Brasilia, 37, E-28028 Madrid (ES). SOLA GURPEGUI, Isabel [ES/ES]; Carretera Estrella, 61, E-31570 San Adrian (ES).

(74) Mandatario: GOMEZ-ACEBO Y DUQUE DE ESTRADA, Ignacio; Jorge Juan, 19, 3º derecha, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, Patente ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada

*Con informe de búsqueda internacional.
Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.*

(54) Title: VECTORS BASED ON RECOMBINANT DEFECTIVE VIRAL GENOMES, AND THEIR USE IN THE FORMULATION OF VACCINES

(54) Título: VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

(57) Abstract

The vectors comprise a recombinant defective viral genome which expresses at least one antigen appropriate for inducing secretory and systemic immune responses or an antibody which provides protection against an infectious agent. The viral defective genome comprises the genome of a parental virus which has the signs of recognition of the viral replicase which are located at the extremities 3' and 5', and comprises additionally internal deletions, and wherein said defective viral genome depends on a complementing virus for its replication and encapsidation. Said vectors are appropriate to form a recombinant system which comprises said expression vector and a complementing virus. The system is appropriate for the preparation of mono- and polyvalent vaccines against infectious agents of various animal species, specially pigs, dogs and cats, and as vehicles for the expression of protection antibodies against infectious agents.

(57) Resumen

Los vectores comprenden un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de respuestas inmunes sistémicas y secretoras o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso. El genoma viral defectivo comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además deleciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación y encapsidación. Estos vectores son adecuados para formar un sistema recombinante que comprende dicho vector de expresión, y un virus complementador. El sistema es adecuado para la elaboración de vacunas mono- y polivalentes frente a agentes infecciosos de distintas especies animales, especialmente cerdos, perros y gatos, y como vehículos para la expresión de anticuerpos protectores frente a agentes infecciosos.

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 7682-049

SERIAL NUMBER: 09/531,375

REFERENCE: AB

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

| | | | | | |
|----|--------------------------|----|---|----|---------------------------|
| AM | Armenia | GB | Reino Unido | MW | Malawi |
| AT | Austria | GE | Georgia | MX | México |
| AU | Australia | GN | Guinea | NE | Níger |
| BB | Barbados | GR | Grecia | NL | Países Bajos |
| BE | Bélgica | HU | Hungria | NO | Noruega |
| BF | Burkina Faso | IE | Irlanda | NZ | Nueva Zelanda |
| BG | Bulgaria | IT | Italia | PL | Polonia |
| BJ | Benín | JP | Japón | PT | Portugal |
| BR | Brasil | KE | Kenya | RO | Rumania |
| BY | Belarús | KG | Kirguistán | RU | Federación Rusa |
| CA | Canadá | KP | República Popular Democrática de Corea | SD | Sudán |
| CF | República Centroafricana | KR | República de Corea | SE | Suecia |
| CG | Congo | KZ | Kazajstán | SG | Singapur |
| CH | Suiza | LI | Liechtenstein | SI | Eslovenia |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Eslovaquia |
| CM | Camerún | LR | Liberia | SN | Senegal |
| CN | China | LT | Lituania | SZ | Swazilandia |
| CS | Checoslovaquia | LU | Luxemburgo | TD | Chad |
| CZ | República Checa | LV | Letonia | TG | Togo |
| DE | Alemania | MC | Mónaco | TJ | Tayikistán |
| DK | Dinamarca | MD | República de Moldavia | TT | Trinidad y Tabago |
| EE | Estonia | MG | Madagascar | UA | Ucrania |
| ES | España | ML | Mali | UG | Uganda |
| FI | Finlandia | MN | Mongolia | US | Estados Unidos de América |
| FR | Francia | MR | Mauritania | UZ | Uzbekistán |
| GA | Gabón | | | VN | Viet Nam |

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a unos vectores basados en
genomas virales defectivos recombinantes que expresan
antígenos adecuados para la inducción de respuestas inmunes
sistémicas y secretoras para la prevención de infecciones en
mucosas y a su empleo con fines vacunales junto con un virus
10. complementador adecuado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La obtención de proteínas recombinantes utilizando
vectores de expresión es un hecho conocido desde hace tiempo.
15 En general, los sistemas de expresión procarióticos y de
levaduras son altamente eficaces y fáciles de usar mientras
que los sistemas de expresión que se utilizan con células
eucarióticas superiores plantean algunos inconvenientes
relacionados con bajos niveles de producción de proteínas y
20 con limitaciones en el rango del hospedador. De los sistemas
de expresión existentes para células eucarióticas superiores,
los vectores a base de baculovirus son los más eficaces en
términos de producción de proteína. Sin embargo, sólo se
pueden utilizar en células de insecto que, como es conocido,
25 glicosilan las proteínas de manera diferente a como lo hacen
las células animales. Adicionalmente, la construcción del
virus recombinante sucede a través de una recombinación
homóloga, lo cual es una técnica laboriosa especialmente
cuando se tienen que analizar numerosas variantes genéticas.
30 Por otra parte, se conocen vectores basados en virus ADN
adecuados para expresar genes heterólogos. No obstante, el
empleo de vectores basados en ADN presenta numerosos
inconvenientes, puesto que se replican en el núcleo de la
célula huésped y pueden llegar a integrarse en dicho genoma,
35 por lo que son poco seguros. Por el contrario, los vectores

basados en ARN superan los inconvenientes asociados con el empleo de virus ADN ya que no se replican en el genoma de la célula huésped sino en el citoplasma, la replicación transcurre vía ARN y no vía ADN, y las posibilidades de que se integren en el genoma son muy pequeñas, por lo que los
5 vectores basados en estos virus ARN son más seguros.

Adicionalmente, se conocen partículas defectivas interferentes (DI), que contienen la cápsida del virión y un genoma defectivo, que son unos mutantes subgenómicos de
10 delección generados mayoritariamente a partir de genomas virales infectivos por un error de replicación. En general, el término "partícula DI" se refiere a virus defectivos que carecen de una región del genoma ARN o ADN, contienen las proteínas y antígenos del virus, requieren la coinfección del
15 virus parental infectivo para replicarse (virus complementador) e interfieren específicamente con el virus complementador homólogo al replicarse a sus expensas [Huang y Baltimore, *Nature*, **226**, 325-327 (1970)]. Los genomas DI surgen por reordenamientos del genoma como resultado de
20 "saltos" de la ARN polimerasa de un ARN molde a otro o de un segmento de un ARN molde a otro segmento del mismo. Estos genomas DI, una vez generados, se amplifican a expensas del genoma parental o del virus amplificador que codifica las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación y que
25 debe competir con los genomas defectivos por tales productos.

Se han obtenido y caracterizado partículas DI de algunos coronavirus tales como el virus de la hepatitis murina (MHV), el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y el coronavirus bovino (BCV), aunque no se han descrito partículas DI
30 derivadas del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGFT). Una de las partículas DI naturales del MHV se ha utilizado como base para desarrollar un vector de expresión en el que el gen exógeno se inserta bajo el control de una secuencia promotora interna de transcripción [Lin and
35 Lai, *J. Virol.*, 6110-6118, Oct. (1993)].

En general, los vectores conocidos de expresión de genes heterólogos basados en partículas DI presentan una serie de inconvenientes relacionados con su especificidad de especie y órgano diana y con su limitada capacidad de clonaje, lo que restringe las posibilidades de uso de estos vectores tanto en investigación básica como en investigación aplicada a fines terapéuticos, incluyendo los fines vacunales.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de disponer de vectores de expresión de genes heterólogos que superen los inconvenientes mencionados. En particular, sería muy adecuado disponer de unos vectores de expresión de genes heterólogos que tuvieran una elevada seguridad y capacidad de clonaje y pudieran ser diseñados de forma que se pudiera controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

La presente invención proporciona una solución al problema existente que comprende un vector basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa antígenos adecuados para inducir una respuesta inmune y para prevenir infecciones causadas por diversos agentes infecciosos de distintas especies animales. Los vectores de expresión de genes (o secuencias de ADN) heterólogos proporcionados por esta invención tienen una elevada seguridad así como una elevada capacidad de clonaje y pueden ser diseñados de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo, por lo que dichos vectores son adecuados para la formulación de vacunas capaces de conferir protección contra infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituye un vector basado en un genoma viral defectivo recombinante, que expresa al menos un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune, en particular, una respuesta inmune sistémica y secretora, frente a agentes infecciosos de distintas especies animales, o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso,

provisto de elevada seguridad y capacidad de clonaje y que puede ser diseñado de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

El genoma viral defectivo que sirve de base para la construcción de dicho vector también constituye un objeto adicional de esta invención.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas que comprende (a) el vector previamente descrito y (b) un virus complementador que facilita las proteínas implicadas en la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituyen unas vacunas capaces de inducir protección frente a infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales que comprende el sistema recombinante previamente descrito junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas vacunas pueden ser mono-, o multivalentes dependiendo de si los vectores de expresión presentes en el sistema recombinante expresan uno, o más antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno, o más agentes infecciosos o uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o mas agentes infecciosos.

Otros objetos proporcionados por esta invención comprenden un método de inmunización de animales que consiste en la administración de dicho sistema recombinante o vacuna, así como un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichas especies.

30

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la estructura del VGPT. El virión es una partícula esférica formada por una envuelta lipídica en cuyo interior se encuentra una molécula de ARN de 28,5 kilobases (kb) de cadena sencilla y polaridad positiva. Este

35

ARN está asociado a la proteína N formando la nucleocápsida. Las proteínas estructurales M y sM se encuentran incluidas en la membrana. La proteína S se agrupa en trimeros y está anclada en la parte externa de la envuelta formando los peplómeros.

La Figura 2 muestra la organización genómica de los cuatro coronavirus secuenciados: MHV, IBV, HCV229E (coronavirus humano 229E) y VGPT. Las fases abiertas de lectura que codifican cada proteína se representan a escala. En cada genoma se indica con flechas el principio de los ARNm que expresa cada virus. El número de ARNm expresados por los virus MHV o VGPT puede variar dependiendo de la cepa viral. En este esquema las flechas del VGPT se corresponden con los ARNm que expresa la cepa THER-1. Los ARNm son 3'-coterminales y se numeran siguiendo un orden decreciente de tamaño.

La Figura 3 muestra la expresión del genoma del VGPT, cepa THER-1. Se indica la disposición de las fases de lectura abierta (ORF) en el genoma: Pol, polimerasa; S, sM, M y N, proteínas estructurales; nsp 3a, 3b y 7, proteínas no estructurales (la proteína 3b no se produce con este virus). El genoma se transcribe en un ARN de igual longitud pero polaridad negativa (-) que servirá de molde para la síntesis de los 7 ARNm (1 a 7). En cada ARNm se representa la secuencia común, líder, del extremo 5' (cuadrado), el tramo de poliadenina en el extremo 3' y la zona que se traduce en cada uno de ellos (líneas gruesas).

La Figura 4 muestra la evolución del título de los aislados del VGPT THER-1 (A) y PUR46-mar 1CC12 (B) con el número de pase a alta multiplicidad de infección (m.d.i.) en células ST.

La Figura 5 muestra los resultados del análisis electroforético de los ARNs producidos en células ST infectadas con virus THER-1 pasado 46 veces a alta m.d.i. El número de pase se indica encima de cada canal mientras que las barras a la izquierda indican la posición de los

marcadores de peso molecular (el ARN genómico del VGPT y marcadores GibcoBRL), expresados en kb. Las barras a la derecha indican los ARNm del VGPT y los ARNs defectivos interferentes (DI). NI, no infectado.

5 La Figura 6 muestra los resultados del análisis en ensayos tipo Northern del ARN de células ST infectadas con el virus THER-1p35.

La Figura 7 muestra los resultados de ensayos tipo Northern del ARN procedente de pases diluidos del virus THER-1-STp41 en células ST.

10 La Figura 8 muestra el efecto del cambio de línea celular en la propagación de los ARNs defectivos A, B y C. El virus THER-1-STp46 se pasó diez veces sin diluir en células IPEC (epitelio intestinal de cerdo), y cinco en células PM (macrófagos porcinos). Figuras 8A y 8B, evolución del título viral con el número de pase en células IPEC y PM, respectivamente. Figura 8C, análisis del ARN de células ST infectadas con virus procedente de los pases 1 y 10 en IPEC (por marcado metabólico con $^{32}\text{P}_i$), o de los pases 1 y 5 en PM (por hibridación con un oligonucleótido complementario al ARN líder).

La Figura 9 muestra la encapsidación de los genomas defectivos A, B y C. La Figura 9A muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, en el que se analiza el ARN extraído de viriones purificados, por medio de centrifugación a través de un colchón de sacarosa del 15% (p/v), del pase 1 y del pase 41. En el canal del pase 41 se observan los ARNs A, B y C, además del genoma parental. Las barras de la izquierda indican marcadores de movilidad en kb. La Figura 9B muestra los resultados del análisis del ARN de viriones del pase 41 purificados por centrifugación a través de colchones o de un gradiente continuo de sacarosa, en ensayos tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder. Como marcadores se utilizaron los ARNs comerciales de GibcoBRL y ARN de viriones del pase 1 (canal a). Canales b y

c, ARN extraído de viriones sedimentados a través de colchones de sacarosa del 31% y 15% (p/v), respectivamente. Canales d y e, ARN extraído de virus purificado a través de un colchón continuo de sacarosa, fracciones de densidad 1,20 y 1,15 g/ml, respectivamente.

La Figura 10 muestra la estrategia de clonaje de los ARNs defectivos DI-B y DI-C, donde se observa una representación esquemática de los fragmentos de ADN complementario (ADNc) obtenidos por RT-PCR utilizando como molde ARN genómico de longitud total (A), DI-B (B) y DI-C (C). Las líneas discontinuas indican la ausencia del fragmento previsto debido a su gran tamaño. Los ARNs defectivos se clonaron en cuatro fragmentos solapantes (a, b, c y d), representados por líneas; los números debajo de estas líneas indican el tamaño del fragmento determinado en geles de agarosa. Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores y su polaridad se indican mediante flechas y números. La secuencia de los oligonucleótidos se indica en la Tabla 2. Las cajas rayadas o abiertas en (A) indican la posición relativa de los genes virales: pol, polimerasa; S, M y N, genes estructurales; 3a, 3b, sM y -, ORFs pequeñas. Los cuadrados negros más estrechos indican la secuencia líder.

La Figura 11 muestra los resultados del análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos en la amplificación de los ARN defectivos. El ARN de viriones purificados THER-1p1 o THER-1p41 se utilizó como molde en una reacción de RT-PCR con los oligonucleótidos 1 y 2 (a), 3 y 4 (b), 5 y 6 (c) o 7 y 8 (d), cuya secuencia y posición en el genoma parental se indica en la Tabla 2. En cada caso se indica el canal correspondiente al ARN molde del pase 1 (ARN genómico parental) o del pase 41 (ARN genómico parental, DI-A, DI-B y DI-C), y el canal de marcadores de movilidad de DNA (M, GibcoBRL). Los números en negrita indican el tamaño en kb de los productos de amplificación específicos de los ARNs defectivos. ARNs B+C, ARNs B y C purificados de banda en un

experimento de fraccionamiento por gel de los ARNs del virus THER-1-STp41. Los ARNs B y C migran muy próximos, y se cortaron como una banda única.

La Figura 12 muestra la secuencia completa del ADNc del
5 ARN DI-C [véase la SEC. ID. N° 24], obtenida por
secuenciación de los fragmentos solapantes de clonaje a, b,
c y d. El ARN DI-C ha mantenido cuatro regiones discontinuas
del genoma parental: I, II, III y IV. Los puntos de unión de
estas regiones se indican en la secuencia mediante flechas.
10 Se indica la traducción de las tres ORFs presentes en el
genoma DI-C: la ORF de 6,7 kb quimérica que resulta de la
fusión de las regiones discontinuas I y II en fase; la mini-
ORF de tres aminoácidos que la precede en fase y la ORF que
comienza en el AUG del gen S. Se han sombreado las regiones
15 de alta homología con los dominios proteicos descritos en
otros coronavirus como responsables de las funciones
polimerasa, helicasa y sitio de unión a metales. Las
secuencias promotoras de transcripción CTAAAC se indican
sombreadas. La zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b
20 (41 nucleótidos) se presenta sombreada, y se indica la
secuencia "de deslizamiento" del ribosoma subrayada, y el
codón de terminación de la ORF1a encuadrado. En las
posiciones 637, 6397 y 6485 se indican los cambios puntuales
respecto al genoma parental. Se indican los nucleótidos
25 presentes en el genoma parental en estas posiciones.

La Figura 13 muestra un diagrama de la estructura del
ARN DI-C. La longitud genómica total se muestra a la derecha
de los recuadros. El ARN DI-C contiene cuatro regiones
discontinuas (I, II, III y IV) del genoma del VGPT. Estas
30 regiones comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la
ORF1b casi completa incluyendo la zona de solapamiento entre
las ORFs 1a y 1b, el principio del gen S, la ORF7 incompleta
y la región 3' no traducida. Las letras y los números sobre
el recuadro del genoma parental indican los genes virales.
35 Los números debajo del recuadro indican la posición en el

genoma parental de los nucleótidos flanqueantes de las regiones discontinuas, tomando como referencia la secuencia del aislado VGPT PUR46-PAR. En el recuadro correspondiente al ARN DI-C, la longitud de las cuatro regiones discontinuas se indica en nucleótidos. En el tercer recuadro se indica el número de nucleótidos derivado de cada gen viral, teniendo en cuenta que las ORFs 1a y 1b se solapan 43 nucleótidos en el genoma parental. Las fases abiertas de lectura que predice el análisis por ordenador se indican por flechas o cabezas de flecha. Pnt, falso lazo (*pseudoknot*); Pol, polimerasa; Mib, dominio de unión a metales (*metal ion binding*); Hel, helicasa; Cd, dominio coservado (*conserved domain*).

La Figura 14 muestra la estructura del ARN DI-B. El ARN DI-B contiene tres regiones discontinuas (I, II y III) del genoma del VGPT que comprenden 2,1 kb del extremo 5' del genoma, la ORF1b completa incluyendo la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b, el principio del gen S, el final de la ORF7 y la región no traducida del extremo 3'. Las letras y los números sobre el recuadro del genoma parental indican los genes virales. Los números debajo del recuadro indican la posición en el genoma parental de los nucleótidos flanqueantes de las regiones discontinuas, tomando como referencia la secuencia del aislado VGPT PUR46-PAR. La heterogeneidad en el tamaño de la delección ocurrida entre las regiones discontinuas II y III hace que en realidad exista una población de genomas DI-B. En el segundo y tercer recuadro se indica la longitud en nucleótidos de las tres regiones discontinuas para los genomas de mayor y menor tamaño, respectivamente. En el tercer recuadro se indica el número de nucleótidos derivado de cada gen viral, teniendo en cuenta que las ORFs 1a y 1b se solapan 43 nucleótidos en el genoma parental. Las fases abiertas de lectura que predice el análisis por ordenador se indican por flechas o cabezas de flecha. Pnt, falso lazo (*pseudoknot*); Pol, polimerasa; Mib, dominio de unión a metales (*metal ion binding*); Hel,

helicasa; Cd, dominio coservado (*conserved domain*).

La Figura 15 muestra la estructura secundaria y terciaria del ARN en la zona de solapamiento entre las ORFs 1a y 1b en el ARN DI-C. (A) Estructura que se predice al considerar la región más cercana a la estructura de horquilla que presenta complementariedad con los nucleótidos del lazo para constituir el *pseudoknot* (nucleótidos 2354 a 2358). La secuencia "de deslizamiento" UUUAAC está subrayada. El codón de terminación de la ORF1a se indica encuadrado. (B) Representación esquemática de este *pseudoknot*, que implica dos tramos de complementariedad de secuencias (*stems*: S1 y S2). La secuencia de deslizamiento se representa encuadrada. (C) Un modelo alternativo considerando la secuencia del nucleótido 2489 al 2493 en el plegamiento del *pseudoknot*. Esta estructura contiene un tramo de complementariedad de secuencia (*stem*) adicional. D) Representación esquemática del *pseudoknot*, en la que se señalan los tres *stems*: S1, S2 y S3.

La Figura 16 muestra el mapeo de los ARNs DI por hibridación con oligonucleótidos específicos para el virus en ensayos tipo Northern. El ARN del virus THER-1-STp41 se fraccionó en geles de agarosa hasta conseguir una separación clara de los ARNs del genoma parental y DI A, B y C. El ARN se transfirió a filtros de nailon que se hibridaron con varios oligonucleótidos marcados con ^{32}P , que hibridaron con el genoma parental (+), e hibridaron (+) o no (-) con los genomas defectivos. La localización aproximada de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos en el genoma parental se indica con flechas. Su secuencia y posición exactas se indican en la Tabla 3. Todos los oligonucleótidos hibridaron con el genoma parental y dieron los resultados esperados con los ARNs B y C.

La Figura 17 muestra un esquema de obtención de virus vacunales por transfección de células infectadas con ARN DI-C. Se ilustra un esquema prototipo de la construcción que permitió la obtención de ARN DI-C por transcripción *in vitro*,

manteniendo los extremos 5' y 3' presentes en la partícula defectiva original. La secuencia del promotor del bacteriófago T7 [PrT7] y la secuencia del ribozima autocatalítico del virus de la hepatitis delta (HDV) [Rz HDV] se clonaron flanqueando la secuencia del ARN DI-C. Sobre la secuencia se señala el punto de corte autocatalítico introducido por la ribozima. Las puntas de flecha indican las posiciones de las secuencias promotoras de transcripción interna mantenidas de forma natural en el ARN DI-C. L, líder.

5 T7 ϕ , señales de terminación de transcripción del bacteriófago T7. Se rescataron viriones que encapsidaron tanto el virus complementador como los genomas defectivos en los que se habían clonado los genes heterólogos, al transfectar los ARNs transcritos *in vitro* sobre células ST infectadas con el virus complementador correspondiente.

10 15

La Figura 18 muestra un esquema prototipo de la construcción que permitió la obtención de pDIA-6A.C3 por transcripción *in vitro*, manteniendo los extremos 3' y 5' presentes en la partícula defectiva original. La secuencia del promotor del bacteriófago T7 [T7Pr] y la presencia del ribozima autocatalítico del virus de la hepatitis delta (HDV) [Rz HDV] se clonaron flanqueando la secuencia del ADNc que codifica un ARN autoreplicativo. El plásmido pDIA-6A.C3 contiene el gen que codifica el anticuerpo monoclonal 6A.C3 que neutraliza el VGPT [véase el Ejemplo 4]. El clonaje del gen heterólogo se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen [IGS: secuencia intergénica; L: secuencia líder; D: región D (diversity region); J: Región J (joining region); VH: Módulo variable de la cadena pesada de inmunoglobulina; CH: Módulo constante de la cadena pesada de inmunoglobulina; VK: Módulo variable de la cadena ligera de inmunoglobulina; CK: Módulo constante de la cadena ligera de inmunoglobulina; polIA: secuencia polIA; T7 ϕ : terminador de la transcripción de T7].

20 25 30 35

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención proporciona vectores de expresión de ADNs heterólogos, basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan, al menos, un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune frente a distintos agentes infecciosos de distintas especies animales, o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, provistos de elevada seguridad y capacidad de clonaje y que pueden ser diseñados de forma que se puede controlar fácilmente su especificidad de especie y su tropismo.

El término "agente infeccioso" en el sentido utilizado en esta descripción incluye a cualquier agente infectivo viral, bacteriano o parasitario que puede infectar a un animal y ocasionarle una patología.

Bajo el término "especie animal" se incluye a animales de cualquier especie, preferentemente mamíferos y más preferentemente de las especies porcina, canina o felina.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vectores de expresión basados en genomas virales defectivos recombinantes que expresan al menos un antígeno adecuado para la inducción de una respuesta inmune sistémica y secretora, para la prevención de infecciones en mucosas, diseñados para poder controlar fácilmente la especificidad de especie y su tropismo para infectar mucosas entéricas o respiratorias, por lo que son muy adecuados para inducir inmunidad en mucosas e inmunidad lactogénica, de especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal. En otra realización particular de esta invención se proporciona un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa, al menos, un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

Los vectores de expresión proporcionados por esta invención comprenden un genoma viral defectivo derivado de un

virus, preferentemente, un virus con genoma ARN y polaridad positiva, que mantiene los extremos 3' y 5' del virus parental, tiene deleciones internas y depende de un virus complementador para su replicación. Por tanto, la invención
5 proporciona, además, un genoma viral defectivo que comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además deleciones internas, y en donde dicho genoma viral defectivo depende de un virus
10 complementador que facilita las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. En una realización particular, el genoma viral defectivo comprende, además, la secuencia completa que codifica la replicasa del virus parental. En
15 este caso, si se desea, el virus complementador puede facilitar sólo las proteínas estructurales necesarias para la encapsidación del genoma viral defectivo recombinante o, alternativamente, las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma viral
20 defectivo recombinante. Cuando el virus del que deriva el genoma defectivo es un virus con genoma ARN, el vector de expresión comprende el ADN complementario (ADNc) a dicho ARN defectivo o un ADNc sustancialmente complementario a dicho ARN defectivo.

25 Los vectores proporcionados por esta invención tienen una elevada capacidad de clonaje, de al menos 18 kb, que es la mayor capacidad de clonaje descrita para un vector basado en virus eucarióticos ARN. Adicionalmente, estos vectores tienen una elevada seguridad puesto que (a) están basados en
30 genomas defectivos, (b) comprenden genomas ARN y no utilizan ADN como intermedio replicativo, y (c) están basados en virus que crecen en el citoplasma de las células infectadas, todo lo cual hace que el genoma defectivo no pueda recombinar con el cromosoma celular.

35 En una realización particular de esta invención se

describe la obtención de genomas ARN defectivos derivados de coronavirus, particularmente, del VGPT. Estos genomas tienen la ventaja adicional de que la frecuencia de recombinación del VGPT es muy baja ($<1 \times 10^9$) lo que hace que el genoma defectivo no recombine con facilidad con el genoma del virus complementador. No obstante, aunque se diese esta recombinación, se obtendría un virus atenuado puesto que la invención contempla la conveniencia de utilizar el mismo virus atenuado tanto como virus complementador como material de partida para la obtención del genoma defectivo.

Los genomas defectivos que constituyen la base de tales vectores pueden obtenerse por pases seriados sin diluir del virus del que derivan, en distintos sistemas celulares. La frecuencia de generación de partículas DI puede variar mucho en distintos sistemas virus-célula, por lo que es conveniente efectuar los pases con distintos aislados del virus en distintas líneas celulares al objeto de seleccionar el aislado y la línea celular adecuados. Al cabo de un cierto número de pases, se aíslan los virus y se utilizan para analizar los ARNs intracelulares producidos en la infección con el fin de observar la posible aparición de bandas que no correspondan a ningún ARN mensajero (ARNm) viral, en cuyo caso, para analizar la naturaleza de esos nuevos ARNs, subgenómicos o defectivos, se continúan los pases seriados sin diluir con el virus parental. Al cabo de unos pases, se analiza la evolución del patrón de ARNs a lo largo de los pases seriados para lo cual se infectan células del sistema celular adecuado con virus procedentes de distintos pases y se analizan los ARNs producidos por técnicas convencionales, por ejemplo, marcaje metabólico con $^{32}\text{P}_i$ o hibridación con un oligonucleótido apropiado. En el Ejemplo 1 se describe de forma detallada la obtención y caracterización de unos ARNs defectivos derivados del VGPT.

Con los ARN defectivos se pueden obtener los ADNc correspondientes, complementarios o sustancialmente

complementarios, a dichos ARN defectivos, mediante una reacción de transcriptasa inversa (RT) y amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), en adelante RT-PCR. A continuación, los ADNc se pueden clonar en plásmidos adecuados, por ejemplo Bluescript II, bajo el control de promotores eficaces. Los plásmidos resultantes contienen el genoma viral defectivo bajo el control de unos elementos reguladores, que contienen las señales de regulación y control de la replicación así como del inicio y terminación de la transcripción y traducción. Así, estos plásmidos pueden incluir secuencias políA, secuencias de corte auto-catalítico o de reconocimiento de enzimas de restricción que permiten la inserción del ADN heterólogo, y las señales de regulación, control y terminación correspondientes.

Los plásmidos conteniendo el genoma defectivo, o el ADNc correspondiente, así obtenidos se pueden manipular por técnicas de Ingeniería Genética convencionales para clonar, al menos, una secuencia de ADN heterólogo, que codifica una determinada actividad, bajo el control del promotor de un gen que esté presente en los genomas defectivos u cualquier otro promotor del virus del que deriva el genoma defectivo o variante de estos promotores con eficiencia aumentada, y de las secuencias reguladoras contenidas en el vector de expresión resultante. En el Ejemplo 2 se describe la generación de vectores de expresión que codifican antígenos que inducen protección frente a distintos virus.

Los vectores de expresión proporcionados por esta invención pueden expresar una o más actividades, tales como uno o más antígenos capaces de inducir respuestas inmunes frente a distintos agentes infecciosos, o uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos. En una realización particular y preferida, estos vectores expresan, al menos, un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune sistémica o una respuesta inmune en mucosas frente a distintos agentes

infecciosos que se propagan en mucosas respiratorias o entéricas. En otra realización particular y preferida, dichos vectores de expresión expresan, al menos, un gen que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG₁, IgA, etc.) que proporciona protección contra un agente infeccioso. En un caso particular el anticuerpo expresado es el anticuerpo monoclonal identificado como 6A.C3 [véase el Ejemplo 4] que neutraliza el VGPT, expresado con isotipos IgG₁ o IgA en el que la parte constante de la inmunoglobulina es de origen porcino.

En una realización particular de esta invención, el clonaje de los genes heterólogos en un plásmido que contenía un ADNc de un ARN defectivo derivado del VGPT, se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen (Ejemplo 2). Alternativamente, las secuencias de ADN heterólogas se pueden clonar en otras zonas del genoma, por ejemplo en las zonas correspondientes a las ORFs 1, 2 ó 7 del VGPT. A partir de los plásmidos resultantes se expresan ARNs utilizando una polimerasa adecuada, con los que se transforman células apropiadas previamente infectadas con un virus colaborador atenuado, con lo que se pueden rescatar viriones conteniendo el genoma del virus complementador y virus con el genoma defectivo (Figura 17).

Alternativamente, los vectores de expresión de esta invención permiten la expresión de uno o varios genes utilizando la misma estrategia arriba descrita. Para ello, se pueden utilizar uno o varios promotores, o bien un promotor y varios sitios de reconocimiento del ribosoma (IRES), o alternativamente varios promotores y un sitio de reconocimiento del ribosoma.

La invención también proporciona un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas que comprende (a) el vector previamente descrito y (b) un virus complementador que facilita las proteínas implicadas en la replicación y

encapsidación del genoma viral defectivo recombinante. Por tanto, se proporciona un sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas basado en genomas virales defectivos recombinantes que expresan proteínas con al menos una

5 determinada actividad, que comprende:

- a) un vector recombinante que contiene un genoma viral defectivo para el que, en su caso, se ha obtenido un ADN manipulable por Ingeniería Genética convencional que tiene las señales de reconocimiento para la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', comprende además unas
10. deleciones internas, y al menos una secuencia de ADN que codifica una actividad, por ejemplo, un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas, o un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso; y
- 15 b) un virus complementador que proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

Alternativamente, el sistema recombinante de expresión de proteínas heterólogas comprende un vector de expresión,

20 del tipo previamente descrito, que comprende la secuencia completa que codifica la replicasa del virus parental y un virus parental complementador que proporciona las proteínas estructurales para la encapsidación del genoma defectivo y, opcionalmente, las proteínas funcionales (replicasa) para la

25 replicación del genoma viral defectivo.

Estos sistemas permiten la expresión bien de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune o bien de anticuerpos que proporcionan protección contra agentes infecciosos, por lo que son adecuados para su empleo con fines vacunales y de

30 protección frente a infecciones.

La invención también proporciona unas vacunas capaces de inducir protección frente a infecciones causadas por distintos agentes infecciosos de distintas especies animales que comprenden (i) el sistema recombinante arriba descrito,

35 constituido por (a) un vector de expresión basado en un

genoma viral defectivo en el que se clona la secuencia de ADN heteróloga y (b) el virus complementador que colabora en la replicación del genoma defectivo, junto con, opcionalmente, (ii) un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las vacunas proporcionadas por esta invención son adecuadas, por tanto, para conferir inmunidad contra distintos agentes infecciosos de distintas especies animales.

Por "conferir inmunidad", en el sentido utilizado en esta descripción, debe entenderse la puesta en marcha en el organismo receptor (animal a tratar), por parte del sistema recombinante previamente descrito, de los mecanismos adecuados, tales como células presentadoras de antígenos, linfocitos B y T, anticuerpos, sustancias potenciadoras de la respuesta celular (interleuquinas, interferones, etc.), factores de necrosis celulares y sustancias similares que hacen que el animal quede protegido frente a infecciones causadas por agentes patógenos.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden ser monovalentes o multivalentes dependiendo de si los vectores de expresión presentes en el sistema recombinante expresan uno o más antígenos capaces de inducir una respuesta inmune frente a uno o más agentes infecciosos. Los vectores de expresión pueden ser monovalentes o polivalentes según expresen uno o más anticuerpos que proporcionan protección contra uno o más agentes infecciosos.

La especificidad de especie se controla de forma que el virus complementador exprese la proteína de la envuelta adecuada para ser reconocida por los receptores celulares de la especie correspondiente. Un grupo particular de vacunas proporcionadas por esta invención comprende como virus complementador un coronavirus, preferentemente, un coronavirus porcino, canino o felino.

Estas vacunas son especialmente adecuadas contra agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, que infecten las mucosas de estas especies o las utilicen como vía de entrada.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas monovalentes capaces de proteger cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, y el tropismo se controla expresando la glicoproteína S de un coronavirus.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos porcinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos porcinos:

10. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Parvovirus porcino*, *Leptospira*, *Escherichia coli*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Pasterella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium* sp., *Serpulina hydiosenteriae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, o contra los patógenos causantes del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos caninos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos caninos: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus), virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

Las vacunas monovalentes contra agentes infecciosos felinos pueden contener un vector de expresión que exprese un antígeno seleccionado del grupo esencialmente constituido por antígenos de los siguientes patógenos felinos: calicivirus del gato, virus de la inmunodeficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino,

rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, Chlamydia psittaci felina, y virus de la leucemia felina.

Los vectores pueden expresar un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, por ejemplo, un agente infeccioso porcino, canino o felino como los citados previamente. En una realización particular, se han elaborado unos vectores que expresan el anticuerpo monoclonal recombinante identificado como 6A.C3 que neutraliza el VGPT.

Las vacunas proporcionadas por esta invención son capaces de proteger a los lechones mediante la inducción de una inmunidad lactogénica, lo que tiene un especial interés en la protección de neonatos frente a infecciones del tracto intestinal.

En general, las vacunas proporcionadas por la invención pueden contener una cantidad de antígeno capaz de introducir en el animal a inmunizar un título de virus complementador de, al menos, 10^8 unidades formadoras de placa (ufp).

Como excipiente puede utilizarse un diluyente tal como suero salino fisiológico u otras soluciones salinas similares. Asimismo, estas vacunas pueden contener también un adyuvante de los habitualmente utilizados en la formulación de vacunas, tanto acuoso, tal como hidróxido de aluminio, Quila, suspensiones de geles de alúmina y similares, como oleoso, a base de aceites minerales, glicéridos y derivados de ácido graso, y sus mezclas, por ejemplo, Marcol 52 (ESSO Española S.A.), Simulsol 5102 (SEPIC) y Montanide 888 (SEPIC).

Estas vacunas también pueden contener sustancias potenciadoras de la respuesta celular (PRC), es decir, sustancias potenciadoras de subpoblaciones de células T helper (Th_1 y Th_2) tales como interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, γ -IFN (gamma interferón), factor de necrosis celular y sustancias similares, que podrían,

teóricamente, provocar inmunidad celular en los animales vacunados. Estas sustancias PRC podrían utilizarse en formulaciones vacunales con adyuvantes acuosos u oleosos. También pueden utilizarse otro tipo de adyuvantes que modulan e inmunoestimulan la respuesta celular tales como el MDP (muramil dipéptido), ISCOM (Immuno Stimulant Complex) o liposomas.

La invención proporciona vacunas multivalentes capaces de prevenir y proteger animales de distintas infecciones. Estas vacunas multivalentes pueden elaborarse a partir de vectores de expresión en los que se han insertado las distintas secuencias que codifican los antígenos correspondientes en el mismo vector recombinante o bien construyendo vectores recombinantes independientes que posteriormente se mezclarían para su co-inoculación junto con el virus complementador. Por tanto, estas vacunas multivalentes comprenden un sistema recombinante en el que el propio vector de expresión contiene más de una secuencia de ADN que codifica más de un antígeno o alternativamente, el sistema recombinante utilizado en la elaboración de la vacuna puede contener distintos vectores de expresión que expresen cada uno de ellos al menos un antígeno distinto. La limitación existente en este tipo de vacunas multivalentes radica en que dichos vectores expresen antígenos de agentes infecciosos de una misma especie animal y que el virus complementador sea el adecuado para tal especie.

Análogamente, se pueden preparar vacunas multivalentes que comprenden vectores multivalentes utilizando secuencias que codifican anticuerpos que proporcionan protección contra agentes infecciosos en lugar de secuencias que codifican los antígenos. Estos vectores pueden contener un sistema recombinante que comprende bien un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN que codifica más de un anticuerpo o bien distintos vectores de expresión que expresan, cada uno de ellos, al menos, un anticuerpo

distinto.

En una realización particular de esta invención se proporcionan vacunas capaces de conferir inmunidad a cerdos, perros y gatos contra distintos agentes infecciosos porcinos, caninos y felinos, respectivamente. Para ello, los vectores de expresión contenidos en el sistema recombinante de la vacuna deben expresar distintos antígenos de los patógenos porcinos, caninos o felinos previamente mencionados.

Las vacunas de esta invención pueden presentarse en forma líquida o liofilizada y pueden prepararse suspendiendo los sistemas recombinantes en el excipiente. Si dichos sistemas estuvieran en forma liofilizada, el propio excipiente podría ser el reconstituyente.

Alternativamente, las vacunas proporcionadas por esta invención se pueden utilizar en combinación con otras vacunas convencionales, ya sea formando parte de las mismas o bien como diluyente o fracción liofilizada para diluirse con otras vacunas ya sean convencionales o recombinantes.

Las vacunas proporcionadas por esta invención pueden administrarse al animal por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol.

La invención también proporciona un método para la inmunización de animales, en particular, cerdos, perros y gatos, contra uno o varios agentes infecciosos de forma simultánea, que comprende la administración por vía oral, nasal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) de una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

Adicionalmente, la invención también proporciona un método para proteger a los animales recién nacidos contra agentes infecciosos que infectan a dichos animales, que consiste en la administración por vía oral, nasal,

subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular o por medio de aerosol (o formas combinadas de éstas) a las madres antes de o durante el periodo de gestación, o a su progenie, una vacuna que contiene una cantidad inmunológicamente eficaz de un sistema recombinante proporcionado por esta invención.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que describen de forma detallada la obtención de genomas virales defectivos, su caracterización, la construcción de plásmidos y su manipulación para obtener los vectores de expresión y la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a diferentes agentes infecciosos de distintas especies.

EJEMPLO 1

15 GENERACION DE PARTICULAS DEFECTIVAS DERIVADAS DEL VGPT

1.1 Pases seriados a alta m.d.i., sin diluir, de cepas de VGPT

Con la finalidad de promover la generación de partículas defectivas, o la imposición de las ya existentes en pequeña proporción en la población viral, se dieron pases seriados de distintos aislados del VGPT sin diluir en distintos sistemas celulares. Debido a que la frecuencia de generación de partículas DI puede variar mucho en distintos sistemas virus-célula, los pases se llevaron a cabo con distintos aislados del VGPT (THER-1 y PUR46-mar 1CC12) en las líneas celulares ST (swine testis, células epiteliales de testículo de cerdo).

La cepa THER-1 [Transmisible gastroenteritis coronavirus Helper Entérico y Respiratorio, estirpe 1] es un mutante atenuado por 20 pases en cultivos de células ST derivado de la cepa PUR46-MAD [Sánchez y col., Virology 174, 410-417 (1990)]. La cepa PUR46-mar 1CC12 también se describe en Sánchez y col., [citado supra].

Cada cepa de VGPT se pasó sin diluir 35 veces en células ST. La m.d.i. del primer pase en cada uno de los tres casos fue de 100 ufp por célula. El sobrenadante de cada pase se

recogió entre las 20 y las 48 horas post-infección (h.p.i.), cuando se observó un efecto citopático claro, normalmente cuando dicho efecto alcanzaba a más de la mitad de la monocapa celular, y la mitad del volumen de este sobrenadante se utilizó en la infección del pase siguiente. La variación del título viral con el número de pase se representa en la Figura 4. El título viral osciló en un rango de dos unidades logarítmicas a lo largo de los pases seriados de cada virus. En el caso de la cepa THER-1, el título en los pases 30 a 46 fue menor que el de los treinta primeros pases.

Los virus que habían sido pasados 35 veces en células ST se utilizaron para analizar los ARNs intracelulares producidos en la infección. Los ARNs, marcados metabólicamente con ^{32}P , entre las horas 6 y 9 postinfección, se analizaron en un gel de agarosa desnaturalizante [Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1982)]. En la infección por el virus THER-1-p35 [virus de la cepa THER-1 pasados 35 veces a alta m.d.i.] se apreciaron tres bandas intensas que no correspondían a ningún ARNm viral, situadas entre las bandas correspondientes al ARN genómico y al mensajero del gen S (Figura 3). Para analizar la naturaleza de estos nuevos ARNs subgenómicos se continuaron los pases seriados sin diluir con la cepa THER-1. Al cabo de 46 pases, se analizó la evolución del patrón de ARNs a lo largo de los pases seriados. Para ello, se infectaron células ST con virus procedentes de varios pases y los ARNs producidos, marcados metabólicamente, se analizaron en un gel de agarosa desnaturalizante (Figura 5). Mientras que en los primeros pases solamente se detectaron los ARNs genómico y mensajeros subgenómicos virales, en el pase 30 se detectaron tres nuevos ARNs de 22, 10,6 y 9,7 kb (ARNs A, B y C, que en la Figura 5 aparecen como DI-A, DI-B y DI-C, respectivamente). Estos ARNs subgenómicos se mantuvieron de forma estable a lo largo de los 15 pases siguientes, interfiriendo notablemente con la

replicación del ARN genómico y la síntesis de los ARNm del virus complementador (Figura 5, canales 30 a 45). Estos resultados indican que los tres ARNs generados o amplificados en los pases seriados sin diluir son estables y que al menos uno de ellos es interferente.

1.2 Caracterización de los ARNs subgenómicos

1.2.1 Análisis de los extremos y las regiones internas

Para determinar si los ARNs subgenómicos A, B y C tenían la estructura estándar de los ARNs defectivos de coronavirus, en particular, si conservaban los extremos 5' y 3' del genoma silvestre y su pequeño tamaño era debido a deleciones internas, se hicieron varios ensayos de hibridación con sondas específicas para el virus. Para ello, el ARN de las células infectadas con el virus THER-1-STp35 [virus de la cepa THER-1 pasados 35 veces en células ST] se extrajo y se analizó su hibridación con sondas específicas virales en un ensayo tipo Northern [Maniatis et al., citado *supra*] usando oligonucleótidos complementarios al líder y a la secuencia del extremo 3' viral. En cada caso se llevó como control el ARN de células infectadas con virus THER-1-p1 [virus de la cepa THER-1 pasados 1 vez en células ST] y de células ST sin infectar (NI) (canales 1 y 2 de cada filtro, respectivamente). Los oligonucleótidos utilizados como sonda son complementarios al ARN líder (posiciones 66-91 del extremo 5' del genoma parental); a la región no traducida del extremo 3' (nucleótidos 28524-28543 del extremo 5' del genoma parental) y a los genes estructurales M y N (posiciones 97-116 y 5-24 a partir del AUG iniciador de cada gen, respectivamente). Las barras de la derecha indican las posiciones de los ARNm virales y los ARNs subgenómicos A, B y C.

Como puede apreciarse en la Figura 6, los dos oligonucleótidos hibridaron con todos los ARNm del virus parental, y también detectaron los ARNs A, B y C, lo que

indica que estos ARNs han sufrido delecciones internas y han mantenido los extremos. Como una primera aproximación al estudio de qué secuencias genómicas estaban presentes en estos ARNs, el ARN de células infectadas se hibridó con oligonucleótidos complementarios a los genes de las proteínas estructurales virales S, M y N. Ninguno de ellos hibridó con los ARNs defectivos, sugiriendo que los genes de las proteínas estructurales estaban delecionados. Por tanto, los ARNs subgenómicos A, B y C, son genomas defectivos, mantienen los extremos del virus parental y tienen delecciones internas.

1.2.2. Propagación de los ARNs A, B y C

Para comprobar que los ARNs A, B y C son genomas defectivos, dependientes del virus parental para su propagación en cultivo, se infectaron células ST con el virus THER-1-STp41 (virus de la cepa THER-1 pasados 41 veces en células ST) a distintas m.d.i.: 10, 0,1, 0,01 y 0,001 ufp/célula. El virus resultante de este pase, recogido a las 10 h.p.i., se tituló y se amplificó en un segundo pase en células ST, que a su vez se utilizó para infectar nuevas células y extraer el ARN citoplásmico [Maniatis et al., citado supra]. El ARN se analizó en un ensayo tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos. Las m.d.i. se indican sobre cada canal (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} y 10 ufp/célula). Como control negativo se incluyó el ARN procedente de una infección de células ST con el virus THER-1-pl, que no contiene ARN subgenómicos, a una m.d.i. de 10 ufp/célula (primer canal). En el canal correspondiente a la infección del virus THER-1-STp41 a una m.d.i. de 10 ufp/célula, control positivo, se señalan los ARNs genómico (ARNm 1), los ARN defectivos A, B y C [representados como DI-A, DI-B, DI-C] y el correspondiente al gen S (ARNm 2).

Se puede observar que cuando la m.d.i. del primer pase (el "cuello de botella" en este experimento, ya que los pases

siguientes son de amplificación) es de 0,1 ufp/célula o menor, los ARNs A, B y C se pierden, en condiciones en que el ARN genómico y los ARNm del virus se detectan en las proporciones esperadas (Figura 7). Los tres ARNs defectivos se mantienen cuando la m.d.i. es de 10 ufp/célula. Dado que los ARNs A, B y C se encuentran en mayor proporción que el ARN genómico en el virus THER-1-p41 utilizado en la infección, estos resultados indican que la replicación o propagación de estos ARNs requiere que las células sean infectadas por virus defectivo y también por el virus complementador. Los ARNs A, B y C requieren, por tanto, funciones del virus complementador que han de ser aportadas en trans. Por consiguiente, los ARNs A, B y C son genomas defectivos, que dependen de un virus complementador para su propagación.

1.2.3 Generación, amplificación, propagación e interferencia in vitro de los ARN DI en otra línea celular.

Debido a que la generación, amplificación, propagación e interferencia in vitro de los ARN DI es específica de la línea celular se ha estudiado el efecto que podría tener un cambio de línea celular en los ARNs defectivos. Para ello, el virus THER-1-STp46 (el virus THER-1 pasado 46 veces a alta m.d.i. en células ST) se sometió a una nueva serie de pases sin diluir, en células epiteliales de intestino de cerdo (IPEC) y macrófagos porcinos (PM). En la Figura 8 se representa la variación del título con el número de pase a lo largo de 10 pases en IPEC (Figura 8A) y 5 pases en PM (Figura 8B). El rendimiento viral en ambas líneas celulares fue menor que el obtenido en células ST, y se estima que la m.d.i. de cada pase varió entre 20 y 0,2 ufp/célula.

El ARN producido en células ST infectadas con THER-1-STp46-IPECp1 [virus THER-1-STp46 pasado 1 vez en células IPEC] y THER-1-STp46-IPECp10 [virus THER-1-STp46 pasado 10 veces en células IPEC] se marcó con $^{32}\text{P}_i$ y se analizó en un gel

de agarosa desnaturalizante (Figura 8C).

El ARN de células ST infectadas con virus THER-1-STp46-PMp1 [virus THER-1-STp46 pasado 1 vez en células PM] y THER-1-STp46-PMp5 [virus THER-1-STp46 pasado 5 veces en células PM] se analizó en un ensayo tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder (Figura 8C).

Los resultados se muestran en la Figura 8C, donde puede apreciarse que los tres ARNs defectivos se mantuvieron en el primer pase en ambas líneas celulares, pero solamente el ARN A persistió a lo largo de, al menos, cinco pases en PM, y de diez pases en IPEC. En ambos casos se señalan las posiciones de los ARNs correspondientes al genoma silvestre (1), ARNs A, B y C (DI-A, DI-B y DI-C respectivamente) y ARNm 2 (proteína S). En el canal correspondiente al ARN del virus THER-1-STp46-PMp5 se indica la posición del ARN genómico, que sólo se observó cuando el tiempo de exposición de la autorradiografía fue diez veces mayor que el de la que se muestra en la Figura 8C.

20 1.3 Encapsidación de los genomas defectivos

Para estudiar si los ARNs defectivos tienen la capacidad de encapsidarse, se hizo una purificación parcial en paralelo de los virus THER-1-STp1 [virus THER-1 pasado 1 vez en células ST] y THER-1-STp41 [virus THER-1 pasado 41 veces en células ST] mediante centrifugación a través de un colchón de sacarosa del 15% peso/volumen. Se extrajo el ARN de los viriones purificados, y se analizó en un gel de agarosa por tinción con bromuro de etidio (Figura 9A). En los viriones del pase 41 se detectaron los ARNs A, B y C con la misma intensidad que el ARN genómico, lo que indica que los tres ARNs defectivos se encapsidan eficientemente.

Para determinar si los genomas defectivos co-encapsidan con el genoma completo o si por el contrario se encapsidan independientemente, se purificó virus THER-1-STp41 por centrifugación a través de colchones de sacarosa de distintas

densidades, o a través de gradientes continuos de sacarosa. El ARN de los viriones purificados en cada caso se analizó en un ensayo de tipo Northern con un oligonucleótido complementario al ARN líder (Figura 9B). Cuando la

5 centrifugación se hizo a través de un colchón de sacarosa del 31% (p/v) ($d=1,19$ g/ml), sólo se detectó genoma silvestre en los viriones sedimentados. Sin embargo, cuando se empleó un colchón de sacarosa de menor densidad, 15% (p/v) ($d=1,11$ g/ml), se detectaron los tres ARNs defectivos además del

10 genoma completo. En un gradiente continuo de sacarosa (15-42%, p/v) se logró el enriquecimiento de viriones defectivos en las fracciones superiores del gradiente (densidad cercana a 1,15 g/ml), y de los viriones estándar en las fracciones inferiores (densidad cercana a 1,20 g/ml) como se observa en

15 la Figura 9B, canales d y e. La banda superior en cada canal corresponde a los genomas silvestre y genoma defectivo A (DI-A), y la banda inferior a los genomas defectivos B y C (DI-B y DI-C). Estos resultados indican que los ARNs A, B y C se encapsidan eficientemente, y que los genomas DI-B y DI-C

20 (10,6 y 9,7 kb) lo hacen independientemente del genoma silvestre, en viriones defectivos que son más ligeros que los viriones estándar.

1.4 Clonaje y secuenciación de los ARN defectivos B y C.

25 Determinación de su estructura primaria.

1.4.1 Síntesis de ADN complementario y amplificación de los ARNs B y C.

El tamaño de los ARNs defectivos B y C se había estimado por su movilidad en los geles de electroforesis, siendo de

30 10,6 y 9,7 kb respectivamente. Debido a su gran tamaño los ARNs defectivos no pudieron ser amplificados en una sola reacción de transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando iniciadores complementarios a los extremos del genoma. Para superar esta limitación, los

35 genomas defectivos se amplificaron en cuatro reacciones

independientes, utilizando parejas de iniciadores que diesen lugar a cuatro fragmentos solapantes que cubriesen la longitud total del genoma en cada caso. Estos fragmentos solapantes se designaron a, b, c y d, ordenados desde el extremo 5' al extremo 3' (Figura 10). Se utilizó como molde el ARN del virus THER-1-STp41, extraído de viriones purificados, que contiene los tres ARNs defectivos A, B y C además del genoma parental. Como control se llevó a cabo en paralelo la amplificación del RN genómico del virus silvestre THER-1.

La secuencia y posición de los oligonucleótidos utilizados como iniciadores en la reacción de RT-PCR se indica en la Tabla 2.

Tabla 2

Características de los oligonucleótidos
utilizados como cebadores en las reacciones RT-PCR

| | SEC. ID. Nº | Polaridad | ORF Coronavirus | Posición en el ARN DI-C ^b | Sitio de Restricción |
|----|----------------|-----------|--------------------|---|-------------------------|
| 20 | 1 | + | Líder VGPT | 15-41 | - |
| | 2 | - | ORF1a FIPV | 1874-1887 | - |
| | 3 ^a | + | ORF1a VGPT | 1524-1550 | XbaI |
| | 4 ^a | - | ORF1b VGPT | 4365-4389 | XbaI |
| 25 | 5 ^a | + | ORF1b HCV229E | 4097-4114 | EcoRI |
| | 6 ^a | - | ORF1b VGPT | 7633-7652 | EcoRI |
| | 7 | + | ORF1b VGPT | 7633-7650 | - |
| | 8 ^a | - | 3'UTR VGPT | 9691-9707 | SpeI |
| | 9 | + | ORF1b VGPT | 8251-8270 | - |

^a: Se ha incluido un sitio de restricción en 5' para facilitar su posterior clonaje.

^b: La posición del oligonucleótido en la correspondiente ORF es en relación con la secuencia mostrada en la Figura 12.

La amplificación por RT-PCR con los iniciadores 1 y 2, del ARN del virus THER-1-STp41 y del ARN del virus parental THER dio lugar a un producto de PCR mayoritario de 1,9 kb (Figura 11, fragmento a). Las bandas minoritarias observadas en esta reacción son debidas a hibridaciones inespecíficas, ya que aparecen en los dos canales. Esta misma reacción de RT-PCR se hizo a partir de un fragmento de agarosa que contenía los ARNs DI-B y DI-C juntos procedentes de una purificación por gel, obteniéndose el mismo resultado. Esto indica que el fragmento a es común a todos los ARNs DI, y corresponde a la región de 1,9 kb del extremo 5' del genoma silvestre del VGFT.

La amplificación con los oligonucleótidos 3 y 4 dio lugar a un producto de PCR único de 2,8 kb a partir del ARN del virus THER-1-STp41 (Figura 11, fragmento b). No se obtuvo ningún producto de PCR a partir del ARN del virus THER-1 control, ya que el tamaño del producto esperado era de 12 kb. De estos datos se deduce que al menos un genoma defectivo tiene un fragmento b de 2,8 kb, y los otros tienen este mismo fragmento o uno mayor que no es detectable en las reacciones de PCR por su gran tamaño.

Los oligonucleótidos 5 y 6, separados 4,6 kb en el genoma parental, dieron lugar a dos productos diferentes de 3,5 y 4,6 kb a partir del ARN del virus THER-1-STp41 (Figura 11, fragmento c). El producto de 4,6 kb se obtuvo también a partir del ARN del virus silvestre llevado como control. Estos resultados sugieren que el fragmento c en al menos un genoma defectivo (probablemente en el genoma defectivo más abundante, DI-C) contiene una delección, dando lugar por PCR a un fragmento de 3,5 kb. El fragmento de 4,6 kb se deriva del genoma parental presente en la población de ARNs del virus THER-1-STp41, y de aquellos genomas defectivos que hayan conservado esta región del genoma.

La amplificación por RT-PCR con los iniciadores 7 y 8 del ARN genómico del virus parental no generó ninguna banda

(Figura 11, fragmento d), ya que la separación entre estos oligonucleótidos es de 9,5 kb en el genoma completo (Figura 10). En contraste, se observaron dos bandas muy intensas de 1,9 y de 2,1 kb cuando se utilizó como molde el ARN del virus THER-1-STp41. Estas bandas se observan como una banda ancha continua, correspondiente al fragmento d (Figura 11), probablemente porque co-migran con un conjunto de bandas minoritarias en el entorno de la banda de 1,9 kb, que dificultan la resolución en los geles. Se ha observado heterogeneidad de tamaños en el fragmento d de clonaje (véase más adelante).

1.4.2 Asignación de los productos de amplificación [a, b, c y d] a los distintos ARNs defectivos.

Con objeto de asignar los fragmentos d de tamaño variable entre 1,9 y 2,1 kb a los distintos genomas defectivos, el ARN del virus THER-1-STp41, que se había utilizado como molde, se fraccionó en un gel de agarosa hasta que se logró una separación clara de las bandas correspondientes a los ARNs del genoma silvestre, DI-A, DI-B y DI-C. Las bandas correspondientes a cada uno de estos cuatro ARNs se cortaron independientemente y se usaron como molde en la reacción de amplificación de RT-PCR con los oligonucleótidos 8 y 9. A partir del ARN genómico purificado de banda no se obtuvo ningún producto de PCR. A partir del ARN DI-B se obtuvo un producto de PCR predominante de 1,9 kb, aunque se obtuvieron también DNAs menos abundantes, de tamaño variable próximo a 1,9 kb, que indican una cierta heterogeneidad en esta zona. La amplificación del ARN DI-C dio lugar a un producto de PCR mayoritario de 2,1 kb. Estos resultados permitieron asignar el fragmento de 1,9 kb al ARN defectivo B, y el fragmento de 2,1 kb al ARN DI-C.

Una vez asignados los fragmentos d, los fragmentos c de 3,5 y 4,6 kb obtenidos con los iniciadores 5 y 6 se asignaron a los ARNs defectivos C y B, respectivamente, ya que la suma

de los fragmentos a a d resultantes de esta asignación coincidía en cada caso con los tamaños de los ARNs B y C estimados por movilidad.

Una vez determinada la secuencia completa de los genomas B y C, se comprobó la asignación de fragmentos mediante la amplificación de cada ARN purificado de banda, utilizando oligonucleótidos que flanqueaban delecciones específicas. La asignación de fragmentos se confirmó también mediante ensayos tipo Northern usando oligonucleótidos que mapeaban en las regiones de la DI-B que no estaban presentes en la DI-C, y viceversa.

1.4.3 Clonaje y secuenciación de los fragmentos solapantes a, b, c y d.

Los cuatro fragmentos de ADN solapantes a (1,9 kb), b (2,8 kb), c (3,5 kb) y d (2,1 kb) complementarios al ARN C se clonaron en Bluescript SK⁻. Se secuenciaron al menos dos clones procedentes de reacciones de RT-PCR independientes. La secuencia de aquellas posiciones que no coincidían en los distintos clones (posiblemente errores de la polimerasa Taq) se secuenciaron directamente de los productos de PCR correspondientes no clonados. De esta forma se determinó la secuencia consenso del ARN DI-C. Se obtuvo una media de 1 error de la polimerasa Taq cada 1,2 kb copiadas. La secuencia completa del genoma DI-C se indica en la Figura 12.

La secuencia completa del ARN DI-C que se obtuvo de esta forma se comparó con la secuencia de las ORFs 1a y 1b del virus PUR46-PAR, [Eleouet et al., Virology 206, 817-822 (1995)], y con la secuencia determinada en nuestro laboratorio de las otras ORFs del virus THER-1. En la secuencia del ARN DI-C completo se encontraron 14 diferencias de nucleótido respecto a la secuencia de la cepa PUR46-PAR. Estas posiciones fueron secuenciadas en la cepa THER-1, el virus parental de los genomas defectivos, para definir los cambios puntuales del ARN genómico defectivo DI-C. La

secuencia del ARN DI-C sólo presentó tres diferencias de nucleótido respecto a la secuencia correspondiente del virus parental, y una inserción en la posición 9189, que no afecta a ninguna fase abierta de lectura (Figura 12).

5

1.4.4 Estructura primaria de los genomas DI-C y DI-B.

Los datos de secuencia indicaron que el genoma DI-C estaba formado por cuatro regiones discontinuas del genoma parental (Figura 13) que comprenden: a) los 2144 nucleótidos del extremo 5' del genoma; b) 4540 nucleótidos que corresponden a la región entre las posiciones 12195-16734 del genoma parental, que incluye la zona solapante entre las fases abiertas de lectura 1a y 1b, y aproximadamente la mitad 5' de la fase abierta de lectura 1b; c) una región de 2531 nucleótidos que corresponde a las posiciones 17843-20372 del genoma silvestre, y que comprende la mitad 3' de la ORF1b y los 8 primeros nucleótidos del gen S, y d) los 493 nucleótidos del extremo 3' viral.

La estructura primaria del genoma DI-B se determinó por secuenciación de los fragmentos de clonaje a y b (comunes a los del genoma DI-C), c (igual al del genoma parental) y d (específico del genoma DI-B). El genoma DI-B está formado por tres regiones discontinuas del genoma (Figura 14): a) los 2144 nucleótidos del extremo 5' del genoma, común a todos los clones de DI-B, e idéntica a la región I del ARN DI-C; b) una región variable en tamaño, de 8178-8243 nucleótidos que corresponden a las posiciones 12195-20369 a 20436 del genoma parental, y que incluye la zona de solapamiento entre las dos fases abiertas de lectura del gen 1, la ORF1b completa, y los primeros nucleótidos del gen S y c) los 278 a 303 nucleótidos de la región 3' del genoma.

Los clones que constituyen la población designada como genomas DI-B difieren en el tamaño de la delección que tuvo lugar entre las regiones II y III, que comienza al principio del gen S (entre los nucleótidos 6 y 73) y acaba al final del

gen-7 (entre los nucleótidos 195 y 233).

La secuencia del extremo 5' del ARN THER-1 parental se determinó por secuenciación directa del ARN, y es 5'-NCUUUUAAAG-3'. La naturaleza del primer nucleótido "N" de la
5 secuencia no se ha determinado. Hasta ahora se ha descrito la secuencia del extremo 5' de tres aislados del virus VGPT: PUR46-PAR, PUR46-BRI y FS772/70, [Eleouet et al., citado
supra; Page et al., Virus Genes 4, 289-301 (1990); Sethna et al., J. Virol. 65, 320-325 (1991)] y todas difieren en el
10 primer nucleótido. La secuencia del líder de los ARNs defectivos debe ser la misma que la del líder del virus parental, dado el intercambio de líderes que se produce en una infección por coronavirus [Makino et al., J. Virol. 57, 729-737 (1986)].

15 Los tres ARNs defectivos contienen poliA, dado que se unen a columnas de oligo dT (resultados no mostrados).

1.4.5 Los ARNs B y C conservan la región solapante entre las ORFs 1a y 1b que incluye el motivo responsable de la traslocación (-1) del ribosoma.
20

De acuerdo con las secuencias asignadas a los genomas DI-C y DI-B, cabe predecir fases abiertas de lectura de 6370 y 10003 nucleótidos respectivamente, que comienzan en el nucleótido 315, contado desde el extremo 5' del genoma. La
25 fase abierta de lectura del ARN DI-C termina en el codón de terminación generado en el sitio de unión de las regiones discontinuas II y III, donde tuvo lugar la delección interna en la fase abierta de lectura 1b, en la posición 6685 del genoma DI-C. La fase abierta de lectura del genoma DI-B
30 termina en el codón de terminación natural de la ORF1b.

Los dos ARNs defectivos han mantenido la zona solapante entre las ORFs 1a y 1b, que incluye la secuencia de deslizamiento y el motivo de estructura terciaria "lazo falso" (*pseudoknot*), responsables de la traslocación (-1) del
35 ribosoma en esta zona [Eleouet y col., citado *supra*]. En la

Figura 15 se representan las posibles estructuras secundarias y terciarias del ARN en esta zona. La estructura propuesta para el pseudoknot en esta zona por Eleouet y col., es la que se indica en C y D, sin embargo hay otras estructuras posibles (como la indicada en A y B) y se desconoce cuál es la correcta.

Se ha descrito que la traslocación ocurre con una eficiencia del 20% en el VGPT (Eleouet y col., citado *supra*) y permite la traducción continua del gen 1. El hecho de que los ARNs DI-B y DI-C (y probablemente el ARN DI-A) hayan mantenido esta región del genoma parental, sugiere que ésta pueda ser necesaria para la replicación del ARN o para la propagación de los genomas.

Hay otras dos fases abiertas de lectura pequeñas en los genomas defectivos DI-C y DI-B. Una de ellas, previa a la fase de lectura larga, codifica un péptido de tres aminoácidos que se encuentra también en el genoma silvestre y de la que se desconoce su función. La otra fase abierta de lectura comienza en los dos casos en el AUG del gen S, y codifica un péptido de 16 aminoácidos en la DI-C, y un péptido de tamaño variable en la DI-B. No se sabe si estas ORFs son funcionales. Las dos únicas secuencias consenso promotoras de transcripción (CUAAAC) del virus que se han mantenido son precisamente las que preceden al gen 1 y al gen S, en los ARNs defectivos B y C. Estas secuencias se señalan en la Figura 12.

En la Figura 16 se muestra el mapeo de los ARNs A, B y C por hibridación con oligonucleótidos específicos para el virus en ensayos tipo Northern. El ARN del virus THER-1-STp41 se fraccionó en geles de agarosa hasta conseguir una separación clara de los ARNs del genoma parental y DI A, B y C. El ARN se transfirió a filtros de nailon que se hibridaron con varios oligonucleótidos marcados con $^{32}\text{P}_i$, que hibridaron con el genoma parental (+), e hibridaron (+) o no (-) con los genomas defectivos. La localización aproximada de las

secuencias complementarias a los oligonucleótidos en el
 genoma parental se indica con flechas. Su secuencia y
 posición exactas se indican en la Tabla 3. Todos los
 oligonucleótidos hibridaron con el genoma parental y dieron
 5 los resultados esperados con los ARNs B y C.

Tabla 3

| | ON | SEC. ID. N° | Polaridad | Gen | Posición en |
|----|----|-------------|-----------|---------|------------------------|
| | | | | en VGPT | el genoma ^a |
| | 1 | 10 | - | Líder | 66-91 |
| | 2 | 11 | - | ORF1a | 2151-2170 |
| 15 | 3 | 12 | - | ORF1a | 6121-6140 |
| | 4 | 13 | - | ORF1a | 9684-8703 |
| | 5 | 14 | - | ORF1a | 12261-12280 |
| | 6 | 15 | - | ORF1b | 14148-14167 |
| | 7 | 16 | - | ORF1b | 17363-17391 |
| 20 | 8 | 17 | - | ORF1b | 18792-18811 |
| | 9 | 18 | - | gen S | 1055-1074 |
| | 10 | 19 | - | gen S | 1980-1999 |
| | 11 | 20 | - | gen S | 3600-3619 |
| | 12 | 21 | - | gen M | 97-116 |
| 25 | 13 | 22 | - | gen N | 5-24 |
| | 14 | 23 | - | UTR-3' | 28524-28543 |

30 ^a: La posición en el genoma se indica como el número de bases desde el extremo 5' del genoma viral silvestre para los oligonucleótidos (ON) complementarios al gen 1 (ORF1a y ORF1b) y la región no traducida del extremo 3' (3'-UTR); y desde el primer nucleótido del ATG iniciador del gen correspondiente, al nucleótido 5' del ON en el caso de los que mapean en los genes S, M y N.

EJEMPLO 2

GENERACION DE VECTORES DE EXPRESION

Se ha clonado el ADNc que codifica el ARN DI-C en un plásmido Bluescript II, bajo el control del promotor del fago T7. Este ADNc incluye secuencias poliA, una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y las señales de terminación del fago T7. Uno de estos plásmidos, cuya construcción se muestra en la Figura 17 ha sido denominado pDIC-1. Estos plásmidos se pueden manipular para clonar en ellos los genes heterólogos bajo el control del promotor del gen S que está presente en el genoma defectivo, u otro promotor del VGPT, o una variante de estos con eficiencia aumentada.

El clonaje de los genes heterólogos se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen.

A partir de estos ADNc se expresaron ARNs utilizando la polimerasa del fago T7, con los que se transformaron células ST previamente infectadas con el virus colaborador atenuado THER-1, con lo que se rescataron viriones conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo correspondiente. Estos virus, liofilizados en presencia de 2% de suero fetal de ternera se utilizaron como vacuna para la inducción de anticuerpos específicos frente a agentes que infectan el tracto gastrointestinal o respiratorio de cerdos, perros y gatos.

El tropismo de los vectores se hizo específico para las especies porcina, canina o felina utilizando los virus complementadores atenuados adecuados.

30

EJEMPLO 3

Inducción de anticuerpos neutralizantes

3.1 Inducción de protección frente al coronavirus PEDV

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido

35

pDÍC-1 en el que se había clonado el gen de la glicoproteína S del coronavirus PEDV.

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por lechón por vía oral.

5 Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos para el virus PEDV utilizando un radioinmunoensayo (RIA) [Maniatis et al., citado *supra*].

10 Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el virus PEDV (estirpe SEG86-1) de lechones de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

15

3.2 Inducción de protección frente al coronavirus canino

Se inmunizaron perros utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (coronavirus canino estirpe Fort Dodge) y el plásmido pDÍC-1 en el que se había clonado el gen de la glicoproteína S del coronavirus canino (estirpe Fort Dodge).

20 Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por perro por vía oral.

25 Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos frente al coronavirus canino utilizando RIA.

30 Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el coronavirus canino (estirpe Fort Dodge) de perros de 10 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

35 3.3 Inducción de protección frente a infecciones causadas por

el arterivirus PRRSV

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido pDIC-1 en el que se había clonado la ORF3 y la ORF5 del
5 arterivirus PRRSV (estirpe Fort Dodge).

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días
10 después de la inmunización, determinándose la presencia de anticuerpos específicos frente a PRRSV utilizando RIA.

Con los sueros recogidos a los 45 días después de la inmunización se proporcionó protección completa frente a la infección por el PRRSV (estirpe Fort Dodge) de lechones de 10
15 días, cuando estos sueros se preincubaron con el virus virulento antes de la administración oral.

EJEMPLO 4**GENERACION DE VECTORES DE EXPRESION**

20 Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 2 se ha clonado un ADNc que codifica un ARN autoreplicativo en un plásmido Bluescript II, bajo el control del promotor del fago T7. Este ADNc incluye secuencias polia, una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) y las
25 señales de terminación del fago T7. Uno de estos plásmidos, cuya construcción se muestra en la Figura 18 ha sido denominado pDIA-6A.C3. Este plásmido contiene el gen que codifica el anticuerpo monoclonal 6A.C3 que neutraliza el VGPT. Las características del anticuerpo monoclonal 6A.C3 y
30 su construcción se describen en la Tesis Doctoral del Dr. D. Joaquín Castilla Castrillón, titulada "Construcción de animales transgénicos secretores de anticuerpos neutralizantes para coronavirus", Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Diciembre 1996, páginas 43-52,
35 65-79.

El clonaje del gen heterólogo se hizo después de la ORF1b, siguiendo el codon iniciador (AUG) del gen S, y en fase de lectura con este gen.

A partir de este ADNc se expresaron ARNs utilizando la polimerasa del fago T7, con los que se transformaron células ST previamente infectadas con el virus colaborador atenuado THER-1, con lo que se rescataron viriones conteniendo el genoma del virus complementador y otros con el genoma defectivo correspondiente. Estos virus, liofilizados en presencia de 2% de suero fetal de ternera pueden utilizarse como vectores para la expresión del anticuerpo monoclonal recombinante 6A.C3. El tropismo de los vectores se hizo específico para la especie porcina utilizando el virus complementador atenuado adecuado.

EJEMPLO 5

Expresión de anticuerpos neutralizantes

Se inmunizaron cerdos utilizando un sistema recombinante constituido por virus complementador (THER-1) y el plásmido pDIA-6A.C3 (Ejemplo 4) que contiene la secuencia que codifica el anticuerpo monoclonal recombinante 6A.C3 que neutraliza el VGPT.

Las inmunizaciones se hicieron por administración de 10^9 ufp por lechón por vía oral.

Se analizó la presencia de anticuerpos 6A.C3 neutralizantes en el suero de los animales vacunados a los 15, 30, 45 y 60 días después de la inmunización utilizando un RIA [Maniatis et al., citado *supra*]. Los anticuerpos recombinantes tenían unos títulos RIA superiores a 10^3 y pueden reducir el título del virus infeccioso en más de 10^4 veces.

DEPOSITO DE MICROORGANISMOS

El plásmido denominado pDIC-1, introducido en una bacteria DH-5 derivada de *E. coli*, [DH5/pDIC-1], ha sido

depositado el 6 de Marzo de 1996, en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), en Porton Down, Salisbury, Whiltshire SP4 OJG (Reino Unido), correspondiéndole el número de acceso P96030641.

- 5 Adicionalmente, el virus complementador atenuado denominado THER-1 ha sido depositado en la ECACC el 6 de Marzo de 1996, correspondiéndole el número de acceso V96030642.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: CYANAMID IBERICA, S.A.
- (B) DIRECCION: CRISTOBAL BORDIU, 35
- (C) CIUDAD: MADRID
- (E) PAIS: ESPAÑA
- (F) CODIGO POSTAL: 28003
- (G) TELEFONO: 34 1 663 91 21
- (H) TELEFAX: 34 1 663 94 01

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

VECTORES BASADOS EN GENOMAS VIRALES DEFECTIVOS
RECOMBINANTES Y SU EMPLEO EN LA FORMULACION DE VACUNAS

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 24

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) MEDIO: Diskete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N° [SEC. ID.
N°]: 1:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 1:

GTGAGTGTAG CGTGGCTATA TCTCTTC

27

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 2:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 2:
CCGTTGTGGT GTCACATTAA C 21

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 3:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 3:
GCCTCTAGAG GAGCTTTGTG GTTCACTTAC AC 32

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 4:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 32 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 4:
GCTCTAGAGC GTTGAATCA ACCCCCAAAA GC 32

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 5:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 26 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
- (iii) HIPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 5:
GGAATTCGG GACTATCCTA AGTGTG 26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 6:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 25 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
- (iii) HIPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 6:
GGAATTCAG CAATACTATT ATCAA 25

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 7:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
 - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
- (iii) HIPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 7:
TTGATAATAG TATTGCTGGC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 8:

GGACTAGTAT CACTATCAAA AGG

23

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 9:

GATGGATGTT GTGGTGTGAG

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 10:

CGAGTTGGTG TCCGAAGACA AAATCT

26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 11:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 11:

ATACGAGCAT CAATATCACC

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 12:

AGAGTTGCCA CAGACTGCAG

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 13:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 13:
CAGCAGATTC AAAGTTACCC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 14:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 14:
CCATTGTAA GCCAACAACC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 15:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 15:
ATCACACTTA GGATAGTCCC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 16:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 19 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) N° DE CADENAS: monocatenaria
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 16:

GTCTAACAAT GTGCCAAGG

19

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 17:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 17:

GCCAGCAATA CTATTATCAA

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 18:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

(iii) HIPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 18:

CACTGTGGCA CCCTTACCTG

20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 19:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) N° DE CADENAS: monocatenaria

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN

50

(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 19:
GTACACCCAC TATGTTGTCT 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 20:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 20:
TTGCGAGTGA AAACAAATGT 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 21:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 21:
CTCACAATCA GACGCTGTAC 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 22:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal

51

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 22:
GACACGTTGT CCCTGGTTGG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 23:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: monocatenaria
(D) TOPOLOGIA: lineal
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 23:
ACATTTTAA CAATCACTAG 20

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA IDENTIFICADA N°: 24:
(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 9714 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) N° DE CADENAS: bicatenaria
(D) TOPOLOGIA: circular
(ii) TIPO DE MOLECULA: ADNc
(iii) HIPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENTIDO: NO
(vi) FUENTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Virus de la gastroenteritis porcina
transmisibile (VGPT)
(B) ESTIRPE: THER-1
(C) AISLADO INDIVIDUAL: DI-C
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. N°: 24:

NCTTTTAAAG TAAAGTGAGT GTAGCGTGGC TATATCTCTT CTTTTACTTT AACTAGCCTT 60
 GTGCTAGATT TTGTCTTCGG ACACCAACTC GAACTAAACG AAATATTTGT ETTTCTATGA 120
 AATCATAGAG GACAAGCGTT GATTATTTCC ATTCAGTTTG GCAATCACTC CTTGGAACGG 180
 GGTGAGCGA ACGGTGCAGT AGGGTTCCGT CCCTATTTCC TAAGTCGCCT AGTAGTAGCG 240
 AGTGCGGTTT CGCCCGTACA ACGTTGGGTA GACCGGGTTC CGTCCTGTGA TCTCCCTCGC 300
 CGGCCGCCAG GAGAATGAGT TCCAAACAAT TCAAGATCCT TGTTAATGAG GACTATCAAG 360
 TCAACGTGCC TAGTCTTCCT ATTCGTGACG TGTTACAGGA AATTAAGTAC TGCTACCGTA 420
 ATGGATTTGA GGGCTATGTT TTCGTACCAG AATACTGTCC TGACCTAGTT GATTGCGATC 480
 GTAAGGATCA CTACGTCATT GGTGTTCTTG GTAACGGAGT AAGTGATCTT AAACCTGTTC 540
 TTCTTACCGA ACCCTCCGTC ATGTTGCAAG GCTTTATTGT TAGAGCTAAC TGCAATGGCG 600
 TTCTTGAGGA CTTTGACCTT AAAATTGCTC GCACTGTCAG AGGTGCCATA TATGTTGATC 660
 AATACATGTG TGGTGCTGAT GGAAAACCAG TCATTGAAGG CGATTTTAAG GACTACTTCG 720
 GTGATGAAGA CATCATTGAA TTGAAGGAG AGGAGTACCA TTGCGCTTGG ACAACTGTGC 780
 GCGATGAGAA ACCGCTGAAT CAGCAAACCTC TCTTTACCAT TCAGGAAATC CAATACAATC 840
 TGGACATTCC TCATAAATTG CCAAACGTG CTACTAGACA TGTAGCACC AAGTCAAAA 900
 AGAACTCTAA AATAGTTCTG TCTGAAGATT ACAAGAAGCT TTATGATATC TTCGGATCAC 960
 CCTTTATGGG AAATGGTGAC TGCTTAGCA AATGCTTTGA CACTCTTCAT TTTATCGCTG 1020
 CTACTCTTAG ATGCCCGTGT GGTCTGAAA GTAGCGGCGT TGGAGATTGG ACTGGTTTTA 1080
 AGACTGCCTG TTGTGGTCTT TGTGGCAAAG TTAAGGGTGT CACTTTGGGT GATATTAAGC 1140
 CTGGTGATGC TGTGTCACT AGTATGAGCG CAGGTAAGGG AGTTAAGTTC TTTGCCAATT 1200
 GTGTTCTTCA ATATGCTGGT GATGTTGAAG GTGTCTCCAT CTGGAAAGTT ATTAAACTT 1260
 TTACAGTTGA TGAGACTGTA TGCACCCCTG GTTTTGAAGG CGAATTGAAC GACTTCATCA 1320
 AACCTGAGAG CAAATCACTA TTGCATGCA GCGTTAAAAG AGCATTCAAT ACTGGTGATA 1380
 TTGATGATGC TGTACATGAT TGTATCATTA CAGGAAAATT GGATCTTAGT ACCAACCTTT 1440
 TTGGTAATGT TGGTCTATTA TTCAAGAAGA CTCATGGTT TGTACAAAAG TGTGGTGCAC 1500
 TTTTGTAGA CGCTTGAAA GTAGTAGAGG AGCTTGTGG TCACTCACA CTTACATACA 1560
 AGCAAATTTA TGAAGTTGTA GCATCACTTT GCACTTCTGC TTTTACGATT GTAAACTACA 1620
 AGCCAACATT TGTGGTTCCA GACAATCGTG TTAAAGATCT TGTAGACAAG TGTGTGAAAG 1680
 TTCTTGTAAG AGCATTTGAT TTTTACGC AGATTATCAC AATAGCTGGT ATTGAGGCCA 1740
 AATGCTTTGT GCTTGGTGCT AAATACCTGT TGTTCAATAA TGCATTGTC AAACCTGTCA 1800
 GTGTTAAAAT CTTGGCAAG AAGCAAAAGG GTCTTGAATG TGCATTCTTT GCTACTAGCT 1860
 TGGTTGGTGC AACTGTTAAT GTGACACCTA AAAGAACAGA GACTGCCACT ATCAGCTTGA 1920
 ACAAGGTTGA TGATGTTGTA GCACCAGGAG AGGGTTATAT CGTCATTGTT GGTGATATGG 1980
 CTTTCTACAA GAGTGGTGAA TATTATTTCA TGATGTCTAG TCCTAATTTT GTTCTTACTA 2040
 ACAATGTTTT TAAAGCAGTT AAAGTTCCAT CTTATGACAT CGTTTATGAT GTTGATAATG 2100
 ATACCAAAAG CAAAATGATT GCAAACTTG GTTCATCATT TGAACAAATA CCAACTGGCA 2160
 CACAAGATCC AATTCGGTTC TGTATTGAAA ATGAAGTTTG TGTTGTCTGT GGTGTTGGC 2220
 TTAACAATGG TTGCATGTGC GATCGTACTT CTATGCAGAG TTTTACTGTT GATCAAAGTT 2280
 ATTTAAACGA GTGCGGGGTT CTAGTGCAGC TCGACTAGAA CCCTGCAATG GACTGATCC 2340
 AGACCATGTT AGTAGAGCTT TTGACATCTA CAACAAAGAT GTTGCCTGTA TTGGTAAATT 2400
 CCTTAAGACG AATTGTTCAA GATTTAGGAA TTTGGACAAA CATGATGCCT ACTACATTGT 2460
 CAAACGTTGT ACAAAGACCG TTATGGACCA TGAGCAAGTC TGTTATAACG ATCTTAAAGA 2520
 TTCTGGTGCT GTTGCTGAGC ATGACTTCTT CACATATAAA GAGGGTAGAT GTGAGTTCCG 2580

TAATGTTGCA CGTAGGAATC TTACAAAGTA CACAATGATG GATCTTTGTT ACGCTATCAG 2640
AAATTTTGAT GAAAAGAACT GTGAAGTTCT CAAAGAAATA CTCGTGACAG TAGGTGCTTG 2700
CACTGAAGAA TTCTTTGAAA ATAAAGATTG GTTTGATCCA GTTGAAAATG AAGCCATACA 2760
TGAAGTTTAT GCAAAACTTG GACCCATTGT AGCCAATGCT ATGCTTAAAT GTGTTGCTTT 2820
TTGCGATGCG ATAGTGGAAG AAGGCTATAT AGGTGTTATA ACACTTGACA ACCAAGATCT 2880
TAATGGCAAT TTCTACGATT TCGGCGATTT CGTGAAGACT GCTCCGGGTT TTGGTTGCGC 2940
TTGTGTTACA TCATATTATT CTTATATGAT GCCTTTAATG GGGATGACTT CATGCTTAGA 3000
GTCTGAAAAC TTTGTGAAAA GTGACATCTA TGGTTCGTAT TATAAGCAGT ATGATTTACT 3060
AGCTTATGAT TTTACCGAAC ATAAGGAGTA CCTTTTCCAA AAATACTTTA AGTACTGGGA 3120
TCGCACATAT CACCCAAATT GTTCTGATTG TACTAGTGAC GAGTGTATTA TTCATTGTGC 3180
TAATTTTAAC ACATTGTTTT CTATGACAAT ACCAATGACA GCTTTTGGAC CACTTGTCCG 3240
TAAAGTTCAT ATTGATGGTG TACCAGTAGT TGTTACTGCA GGTTACCATT TCAACAACCT 3300
TGGTATAGTA TGAATCTTG ATGTAAATTT AGACACAATG AAGTTGAGCA TGACTGATCT 3360
TCTTAGATTT GTCACAGATC CAACACTTCT TGTAGCATCA AGCCCTGCAC TTTTAGACCA 3420
GCGTACTGTC TGTTCCTCCA TTGCAGCTTT GAGTACTGGT ATTACATATC AGACAGTAAA 3480
ACCAGGTCAC TTTAACAAGG ATTTCTACGA TTTCATAACA GAGCGTGGAT TCTTTGAAGA 3540
GGGATCTGAG TTAACATTAA AACATTTTTT CTTTGCACAG GGTGGTGAAG CTGCTATGAC 3600
AGACTTCAAT TATTATCGCT ACAATAGAGT CACAGTACTT GATATTTGCC AAGCTCAATT 3660
TGTTTACAAA ATAGTTGGCA AGTATTTTGA ATGTTATGAC GGTGGGTGCA TTAATGCTCG 3720
TGAAGTTGTT GTTACAAACT ATGACAAGAG TGCTGGCTAT CCTTTGAACA AATTTGGTAA 3780
AGCTAGACTT TACTACGAAA CTCTTTTATA TGAAGAGCAG GATGCACTTT TTGCTTTAAC 3840
AAAGAGAAAT GTTTTACCCA CAATGACTCA AATGAATTTG AAATACGCTA TTTCTGGTAA 3900
GGCAAGAGCT CGTACAGTAG GAGGAGTTTC ACTTCTTTCT ACCATGACTA CGAGACAATA 3960
TCATCAGAAG CATTTGAAGT CAATTGCTGC AACACGCAAT GCTACTGTGG TCATTGGTTC 4020
AACCAAGTTT TATGGTGGTT GGGACAATAT GCTTAAAAAT TTAATGCGTG ATGTTGATAA 4080
TGGTTGTTTG ATGGGATGGG ACTATCCTAA GTGTGACCGT GCTTTACCTA ATATGATTAG 4140
AATGGCTTCT GCCATGATAT TAGGTTCTAA GCATGTTGGT TGTGTACAC ATAATGATAG 4200
GTTCTACCGC CTCTCCAATG AGTTAGCTCA AGTACTCACA GAAGTTGTGC ATTGCACAGG 4260
TGGTTTTTAT TTTAAACCTG GTGGTACAAC TAGCGGTGAT GGTACTACAG CATATGCTAA 4320
CTCTGCTTTT AACATCTTTC AAGCTGTTTC TGCTAATGTT AATAAGCTTT TGGGGGTGA 4380
TTCAAACGCT TGTAACAACG TTACAGTAAA ATCCATACAA CGTAAAATTT ACGATAATTG 4440
TTATCGTAGT AGCAGCATTG ATGAAGAATT TGTTGTTGAG TACTTTAGTT ATTTGAGAAA 4500
ACACTTTTCT ATGATGATTT TATCTGATGA TGGAGTTGTG TGCTACAACA AAGATTATGC 4560
GGATTTAGGT TATGTAGCTG ACATTAATGC TTTTAAAGCA ACACTTTATT ACCAGAATAA 4620
CGTCTTTATG TCCACTTCTA AGTGTGGGGT AGAACCAGAT CTTAGTGTG GACCACATGA 4680
ATTTTGTTC CAGCATACAT TGCAGATTGT TGGGCCTGAT GGAGACTACT ATCTTCCCTA 4740
TCCAGACCCG TCCAGAATTT TGTCAGCTGG TGTGTTTGTT GATGACATAG TTAACAACA 4800
CAATGTTATT ATGTTAGAAC GTTACGTGTC ATTGGCTATT GACGCATACC CGCTCACAAA 4860
ACACCCCTAAG CCTGCTTATC AAAAAAGTGT TTACACTCTA CTAGATTGGG TTAACATCT 4920
ACAGAAAAAT TTGAATGCAG GTGTTCTTGA TTCGTTTCA GTGACAATGT TAGAGGAAGG 4980
TCAAGATAAG TTCTGGAGTG AAGAGTTTTA CGCTAGCCTC TATGAAAAGT CCACTGTCTT 5040
GCAAGCTGCA GGCATGTGTG TAGTATGTGG TTCGAAACT GTACTTCGTT GTGGAGACTG 5100
TCTTAGGAGA CCACTTTTAT GCACGAAATG TGCTTACGAC CATGTTATGG GAACAAAGCA 5160

TAAATTCATT ATGTCTATCA CACCATATGT GTGTAGTTTT AATGGTTGTA ATGTCAATGA 5220
 TGTTACAAAG TTGTTTTTAG GTGGTCTTAG TTATTATTGT ATGAACCACA AACCACAGTT 5280
 GTCATTCCCA CTCTGTGCTA ATGGCAACGT TTTTGGTCTA TATAAAAGTA GTGCAGTCGG 5340
 CTCAGAGGCT GTTGAAGATT TCAACAAACT TGCAGTTTCT GACTGGACTA ATGTAGAAGA 5400
 CTACAAACTT GCTAACAATG TCAAGGAATC TCTGAAAATT TTCGCTGCTG AAAGTGTGAA 5460
 AGCTAAGGAG GAGTCTGTGA AATCTGAATA TGCTTATGCT GTATTAAAGG AGGTTATCGG 5520
 CCCTAAGGAA ATTGTACTCC AATGGGAAGC TTCTAAGACT AAGCCTCCAC TTAACAGAAA 5580
 TTCAGTTTTT ACGTGTTTTT AGATAAGTAA GGATACTAAA ATTC AATTAG GTGAATTTGT 5640
 GTTTGAGCAA TCTGAGTACG GTAGTGATTC TGTTTATTAC AAGAGCACGA GTACTTACAA 5700
 ATTGACACCA GGTATGATTT TTGTGTTGAC TTCTCATAAT GTGAGTCCTC TTAAAGCTCC 5760
 AATTTTAGTC AACCAAGAAA AGTACAATAC CATATCTAAG CTCTATCCTG TCTTTAATAT 5820
 AGCGGAGGCC TATAATACAC TGTTTCCTTA CTACCAAATG ATAGGTAAGC AAAAATTTAC 5880
 AACTATCCAA GGTCTCCTG GTAGCGGTAA ATCTCATTGT GTTATAGGTT TGGGTTTGTA 5940
 TTACCCTCAG GCGAGAATAG TCTACACTGC ATGTTCTCAT GCGGCTGTAG ACGCTTTATG 6000
 TGAAAAGCA GCCAAAACT TCAATGTTGA TAGATGTTCA AGGATAATAC CTCAAAGAAT 6060
 CAGAGTTGAT TGTTACACAG GCTTTAAGCC TAATAACACC AATGCGCAGT ACTTGTTTTG 6120
 TACTGTTAAT GCTCTACCAG AAGCAAGTTG TGACATTGTT GTAGTTGATG AGGTCTCTAT 6180
 GTGTACTAAT TATGATCTTA GTGTCATAAA TAGCCGACTG AGTTACAAAC ATATTGTTTA 6240
 TGTTGGAGAC CCACAGCAGC TACCAGCTCC TAGAACTTTG ATTAATAAGG GTGTACTTCA 6300
 ACCGCAGGAT TACAATGTTG TAACCAAAG AATGTGCACA CTAGGACCTG ATGTCTTTTT 6360
 GCATAAATGT TACAGGTGCC CAGCTGAAAT TGTTAAACA GTCTCTGCAC TTGTTTATGA 6420
 AAATAAATTT GTACCTGTCA ACCCAGAATC AAAGCAGTGC TTCAAATGT TTGTAAAAGG 6480
 TCAGATTCAG ATTGAGTCTA ACTCTTCTAT AAACAACAAG CAACTAGAGG TTGTCAAGGC 6540
 CTTTTTAGCA CATAATCCAA AATGGCGTAA AGCTGTTTTT ATCTCACCTC ATAATAGTCA 6600
 AAATTATGTT GCTCGGCGTC TTCTTGTTTT GCAAACGCAA ACTGTGGATT CCGCTCAGGG 6660
 TAGTGAGTAT GATTACGTCA TCTAGCTGCT CTGAAGATTT TTAATCCTGC TGCAATTCAC 6720
 GATGTGGGTA ATCCAAAAGG CATCCGTTGT GCTACAACAC CAATACCATG GTTTTGTTAT 6780
 GATCGTGATC CTATTAATAA CAATGTTAGA TGCTGGATT ATGACTATAT GGTACATGGT 6840
 CAAATGAATG GTCTTATGTT ATTTTGGAAC TGTAATGTAG ACATGTACCC AGAGTTTTCA 6900
 ATTGTTTGTA GATTTGATAC TCGCACTCGC TCTAAATTGT CTTTAGAAGG TTGTAATGGT 6960
 GGTGCATTGT ATGTTAATAA CCATGCTTTC CACACACCAG CTTATGATAG AAGAGCTTTT 7020
 GCTAAGCTTA AACCTATGCC ATTCTTTTAC TATGATGATA GTAATTGTGA ACTTGTGAT 7080
 GGGCAACCTA ATTATGTACC ACTTAAGTCA AATGTTTGCA TAACAAAATG CAACATTGGT 7140
 GGTGCTGTCT GCAAGAAGCA TGCTGCTCTT TACAGAGCGT ATGTTGAGGA TTACAACATT 7200
 TTTATGCAGG CTGGTTTTAC AATATGGTGT CCTCAAACT TTGACACCTA TATGCTTTGG 7260
 CATGGTTTTG TTAATAGCAA AGCACTTCAG AGCTAGAAA ATGTGGCTTT TAATGTCGTT 7320
 AAGAAAGGTG CCTTCACCGG TTTAAAAGGT GACTTACCAA CTGCTGTTAT TGCTGACAAA 7380
 ATAATGGTAA GAGATGGACC TACTGACAAA TGTATTTTAA CAAATAAGAC TAGTTTACCT 7440
 ACAAATGTAG CTTTTGAGTT ATATGCAAAA CGCAAACCTG GACTCACACC TCCATTAAACA 7500
 ATACTTAGGA ATTTAGGTGT TGTCGCAACA TATAAGTTT TGTTGTGGGA TTATGAAGCT 7560
 GAACGTCCTT TCTCAAATTT CACTAAGCAA GTGTGTTTCT ACACTGATCT TGATAGTGAA 7620
 GTTGTAACAT GTTTTGATAA TAGTATTGCT GGCTCTTTTG AGCGTTTTAC TACTACAAGA 7680
 GATGCAGTGC TTATTTCTAA TAACGCTGTG AAAGGGCTTA GTGCCATTAA ATTACAATAT 7740

GGCCTTTTGA ATGATCTACC TGTAAGTACT GTTGGAAATA AACCTGTCAC ATGGTATATC 7800
TATGTGCGCA AGAATGGTGA GTACGTCGAA CAAATCGATA GTTACTATAC ACAGGGACGT 7860
ACTTTTGAAA CCTTCAAACC TCGTAGTACA ATGGAAGAAG ATTTTCTTAG TATGGATACT 7920
ACACTCTTCA TCCAAAAGTA TGGTCTTGAG GATTATGGTT TTGAACACGT TGTATTTGGA 7980
GATGTCTCTA AAACCTACCAT TGGTGGTATG CATCTTCTTA TATCGCAAGT GCGCCTTGCA 8040
AAAATGGGTT TGTTCCTCGT TCAAGAATTT ATGAATAATT CTGACAGTAC ACTGAAAAGT 8100
TGTTGTATTA CATATGCTGA TGATCCATCT TCTAAGAATG TGTGCACTTA TATGGACATA 8160
CTCTTGACG ATTTTGTGAC TATCATTAAAG AGCTTAGATC TTAATGTTGT GTCCAAAGTT 8220
GTGGATGTCA TTGTAGATTG TAAGGCATGG AGATGGATGT TGTGGTGTGA GAATTCACAT 8280
ATTAAACCT TCTATCCACA ACTCCAATCT GCTGAATGGA ATCCCGGCTA TAGCATGCCT 8340
ACACTGTACA AAATCCAGCG TATGTGTCTC GAACGGTGTA ATCTCTACAA TTATGGTGCA 8400
CAAGTGAAAT TACCTGATGG CATTACTACT AATGTCGTTA AGTATACTCA GTTGTGTCAA 8460
TACCTTAACA CTACTACATT GTGTGTACCA CACAAAATGC GTGTATTGCA TTTAGGAGCT 8520
GCTGGTGCAT CTGGTGTGTC TCCTGGTAGT ACTGTATTAA GAAGATGGTT ACCAGATGAT 8580
GCCATATTGG TTGATAATGA TTTGAGAGAT TACGTTTCCG ACGCAGACTT CAGTGTTACA 8640
GGTGATTGTA CTAGTCTTTA CATCGAAGAC AAGTTTGATT TGCTCGTCTC TGATTATAT 8700
GATGGCTCCA CAAAATCAA TGACGGTGAA AACACGTCGA AAGATGGTTT CTTTACTTAT 8760
ATTAATGGTT TCATTAAAGA GAAACTGTCA CTTGGTGGAT CTGTTGCCAT TAAATCACG 8820
GAATTTAGTT GGAATAAAGA TTTATATGAA TTGATTCAAA GATTTGAGTA TTGGACTGTG 8880
TTTTGTACAA GTGTAAACAC GTCATCATCA GAAGGCTTTC TGATTGGTAT TAACTACTTA 8940
GGACCATACT GTGACAAAGC AATAGTAGAT GGAAATATAA TGCATGCCAA TTATATATTT 9000
TGGAGAAACT CTACAATTAT GGCTCTATCA CATAACTCAG TCCTAGACAC TCCTAAATTC 9060
AAGTGTGCTT GTAACAACGC ACTTATTGTT AATTTAAAAG AAAAAGAATT GAATGAAATG 9120
GTCATTGGAT TACTAAGGAA GGGTAAGTTG CTCATTAGAA ATAATGGTAA GTTACTAAAC 9180
TTTGTTAACC ACTTCGTAA CACACCATGA AAAAATGCTG TATTTATTAC AGTTTTAATC 9240
TTACTACTAA TTGGTAGACT CCAATTATTA GAAAGACTAT TACTTAATCA CTCTTCAAT 9300
CTTAAACTG TCAATGACTT TAATATCTTA TATAGGAGTT TAGCAGAAAC CAGATTACTA 9360
AAAGTGGTGC TTCGAGTAAT CTTTCTAGTC TTACTAGGAT TTTGCTGCTA CAGATTGTTA 9420
GTCACATTAA TGTAAGGCAA CCCGATGTCT AAAACTGGTT TTTCCGAGGA ATTACTGGTC 9480
ATCGCGCTGT CTACTCTTGT ACAGAATGGT AAGCACGTGT AATAGGAGGT ACAAGCAACC 9540
CTATTGCATA TTAGGAAGTT TAGATTTGAT TTGGCAATGC TAGATTAGT AATTTAGAGA 9600
AGTTTAAAGA TCCGCTACGA CGAGCCAACA ATGGAAGAGC TAACGTCTGG ATCTAGTGAT 9660
TGTTTAAAT GTAAAATTGT TTGAAAATTT TCCTTTTGAT AGTGATACAA AAAA 9714

REIVINDICACIONES

1. Un genoma viral defectivo que comprende el genoma de un virus parental que tiene las señales de reconocimiento de la replicasa viral localizadas en los extremos 3' y 5', que comprende además delecciones internas, y en el que dicho genoma viral defectivo depende de un virus complementador para su replicación.
2. Un genoma según la reivindicación 1, que comprende, además, la secuencia completa que codifica la replicasa del virus parental.
3. Un genoma según las reivindicaciones anteriores, en el que dicho virus parental es un coronavirus.
4. Un genoma según las reivindicaciones anteriores, que comprende un genoma defectivo de un coronavirus porcino, canino o felino.
5. Un genoma según la reivindicación 4, que comprende un genoma defectivo del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT).
6. Un genoma según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho virus complementador es el virus parental.
7. Un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un antígeno capaz de inducir respuestas inmunes sistémicas y secretoras, que comprende un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 1 a 6, o su correspondiente ADN complementario (ADNc), y al menos, una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad

sistémica y en mucosas.

8. Un vector según la reivindicación 7, que comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales
5 codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

9. Un vector de expresión basado en un genoma viral defectivo recombinante que expresa al menos un anticuerpo
10 que proporciona protección contra un agente infeccioso, que comprende un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 1 a 6, o su correspondiente ADN complementario (ADNc), y al menos, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección
15 contra un agente infeccioso.

10. Un vector según la reivindicación 9, que comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un anticuerpo que proporciona protección
20 contra un agente infeccioso.

11. Un sistema recombinante basado en virus defectivos recombinantes que expresan, al menos, un antígeno capaz de inducir inmunidad sistémica y en
25 mucosas, que comprende:

a) un vector de expresión recombinante basado en un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 7 u 8, que contiene, al menos, una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en
30 mucosas; y

b) un virus complementador.

12. Un sistema según la reivindicación 11, en el que dicho vector de expresión comprende más de una secuencia
35 de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno

distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

5 13. Un sistema según la reivindicación 11, que comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene una secuencia de ADN distinta que codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

10 14. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho virus complementador es el virus parental del que deriva el genoma viral defectivo.

15 15. Un sistema según la reivindicación 14, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

20 16. Un sistema según la reivindicación 14, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas estructurales para la encapsidación del genoma defectivo.

25 17. Un sistema recombinante basado en virus defectivos recombinantes que expresan, al menos, un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, que comprende:

30 a) un vector de expresión recombinante basado en un genoma viral defectivo según las reivindicaciones 9 ó 10, que contiene, al menos, una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso, y

b) un virus complementador.

35 18. Un sistema según la reivindicación 17, en el que

dicho vector de expresión comprende más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

5 19. Un sistema según la reivindicación 17, que comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene una secuencia de ADN distinta que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

10 20. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que dicho virus complementador es el virus parental del que deriva el genoma viral defectivo.

15 21. Un sistema según la reivindicación 20, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas funcionales y estructurales para la replicación y encapsidación del genoma defectivo.

20 22. Un sistema según la reivindicación 20, en el que dicho virus complementador proporciona las proteínas estructurales para la encapsidación del genoma defectivo.

25 23. Una vacuna capaz de inducir protección en animales frente a un agente infeccioso, que comprende una cantidad adecuada de un sistema recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 22, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 24. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica un antígeno capaz de conferir inmunidad sistémica y en
35 mucosas.

25. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

26. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN distinta que codifica un antígeno distinto capaz de conferir inmunidad sistémica y en mucosas.

27. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

20

28. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto de un patógeno porcino.

25

29. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos porcinos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno porcino.

30

30. Una vacuna según las reivindicaciones 27 a 29, en

35

la que dicho patógeno porcino se selecciona de un grupo constituido esencialmente por: *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Parvovirus porcino*, *Leptospira*, *Escherichia coli*,
5 *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Pasterella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium sp.*, *Serpulina hydrosenteriae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), coronavirus respiratorio porcino, rotavirus, o contra los patógenos causantes del
10 síndrome respiratorio y reproductivo porcino, la enfermedad de Aujeszky (Pseudorabies), influenza porcina o gastroenteritis transmisible y el agente etiológico de la rinitis atrófica y de la ileitis proliferativa.

15 31. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno
20 canino.

32. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende un
25 vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto de un patógeno canino.

33. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos caninos, en la que el sistema recombinante comprende
30 distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno canino.

34. Una vacuna según las reivindicaciones 31 a 33, en la que dicho patógeno canino se selecciona de un grupo constituido esencialmente por: herpesvirus caninos, adenovirus canino tipos 1 y 2, parvovirus canino tipos 1 y 2, reovirus canino, rotavirus canino, coronavirus canino, virus de la parainfluenza canina, virus de la influenza canina, virus del moquillo (Distemper virus), virus de la rabia, retrovirus y calicivirus canino.

35. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno felino.

36. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un antígeno distinto de un patógeno felino.

37. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra agentes infecciosos felinos, en la que el sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un antígeno de un patógeno felino.

38. Una vacuna según las reivindicaciones 35 a 37, en la que dicho patógeno felino se selecciona de un grupo esencialmente constituido por: calicivirus del gato, virus de la inmunodeficiencia felina, herpesvirus felinos, virus de la panleucopenia felina, reovirus felino,

rotavirus felino, coronavirus felino, virus de la peritonitis infecciosa del gato, virus de la rabia, Chlamydia psittaci felina y virus de la leucemia felina.

5 39. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

10 40. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende un vector de expresión que contiene más de una secuencia de ADN, cada una de las cuales codifica un anticuerpo que proporciona
15 protección contra un agente infeccioso.

 41. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que dicho sistema recombinante comprende distintos vectores de expresión cada uno de los cuales contiene al menos una
20 secuencia de ADN distinta que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra un agente infeccioso.

 42. Una vacuna según la reivindicación 23, adecuada para conferir inmunidad contra un agente infeccioso
25 porcino, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo que proporciona protección contra dicho agente infeccioso porcino.

30 43. Una vacuna según la reivindicación 42, en la que el sistema recombinante comprende al menos un vector de expresión que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo monoclonal identificado como 6A.C3
35 capaz de neutralizar el virus de la gastroenteritis

porcina transmisible (VGPT).

5 44. Una vacuna según la reivindicación 23, en la que el virus complementador del sistema recombinante comprende un coronavirus.

45. Una vacuna según la reivindicación 44, en la que dicho coronavirus se selecciona del grupo formado por coronavirus porcinos, caninos y felinos.

| | | | |
|--|----------|----------------------------|--------------------------|
| Referencia del expediente del solicitante o del mandatario | PCT.1/97 | Solicitud internacional n° | PCT / E S 97 / 0 0 0 5 9 |
|--|----------|----------------------------|--------------------------|

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

REC'D 01 APR 1997

WIPO

PCT

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción
página 41 línea 35

B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO

Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria



Nombre de la institución de depósito

EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES (ECACC)

Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país)

Porton Down

Salisbury

Wiltshire SP4 0JG

Reino Unido

Fecha de depósito

6 de Marzo de 1.996 (06.03.96)

n° de orden

P96030641

C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario)

Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos

**D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES**

(caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)

E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)

Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito")

Reservado a la oficina receptora



Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado



Reservado a la Oficina internacional



Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:

Funcionario autorizado

| | | | |
|--|----------|----------------------------|--------------------------|
| Referencia del expediente del solicitante o del mandatario | PCT.1/97 | Solicitud internacional n° | PCT / E 5 97 / 0 0 0 5 9 |
|--|----------|----------------------------|--------------------------|

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

(Regla 13 bis del PCT)

REC'D 01 APR 1997

WIPO PCT

| | |
|---|--------------------------|
| A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>42</u> , línea <u>6</u> | |
| B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Nombre de la institución de depósito EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES (ECACC) | |
| Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG Reino Unido | |
| Fecha de depósito 6 de Marzo de 1.996 (06.03.96) | n° de orden V96030642 |
| C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/> | |
| | |
| D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados) | |
| | |
| E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario) Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito") | |
| | |

Reservado a la oficina receptora

☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado



Reservado a la Oficina internacional

☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:

Funcionario autorizado

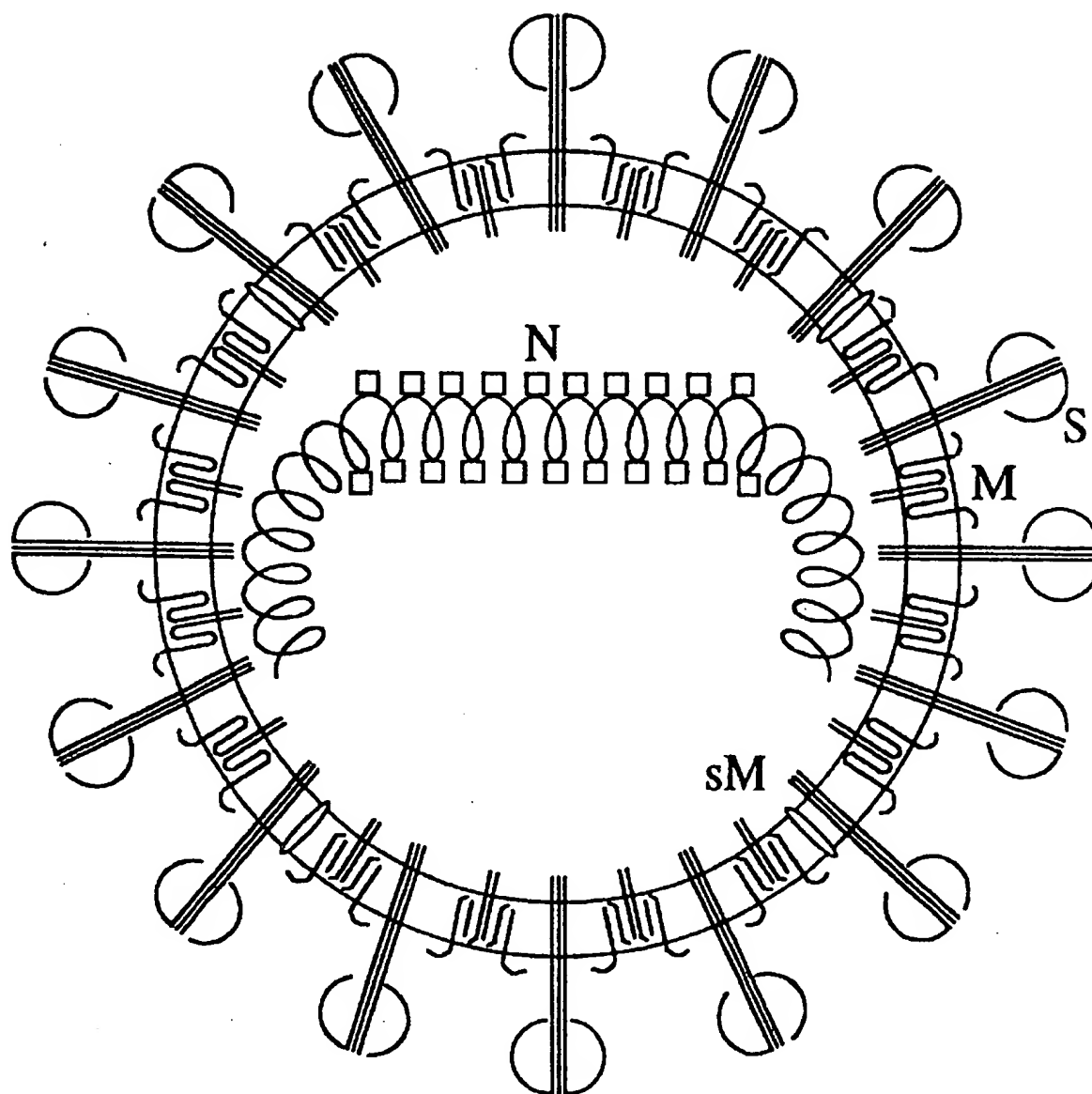


FIG. 1

2/27

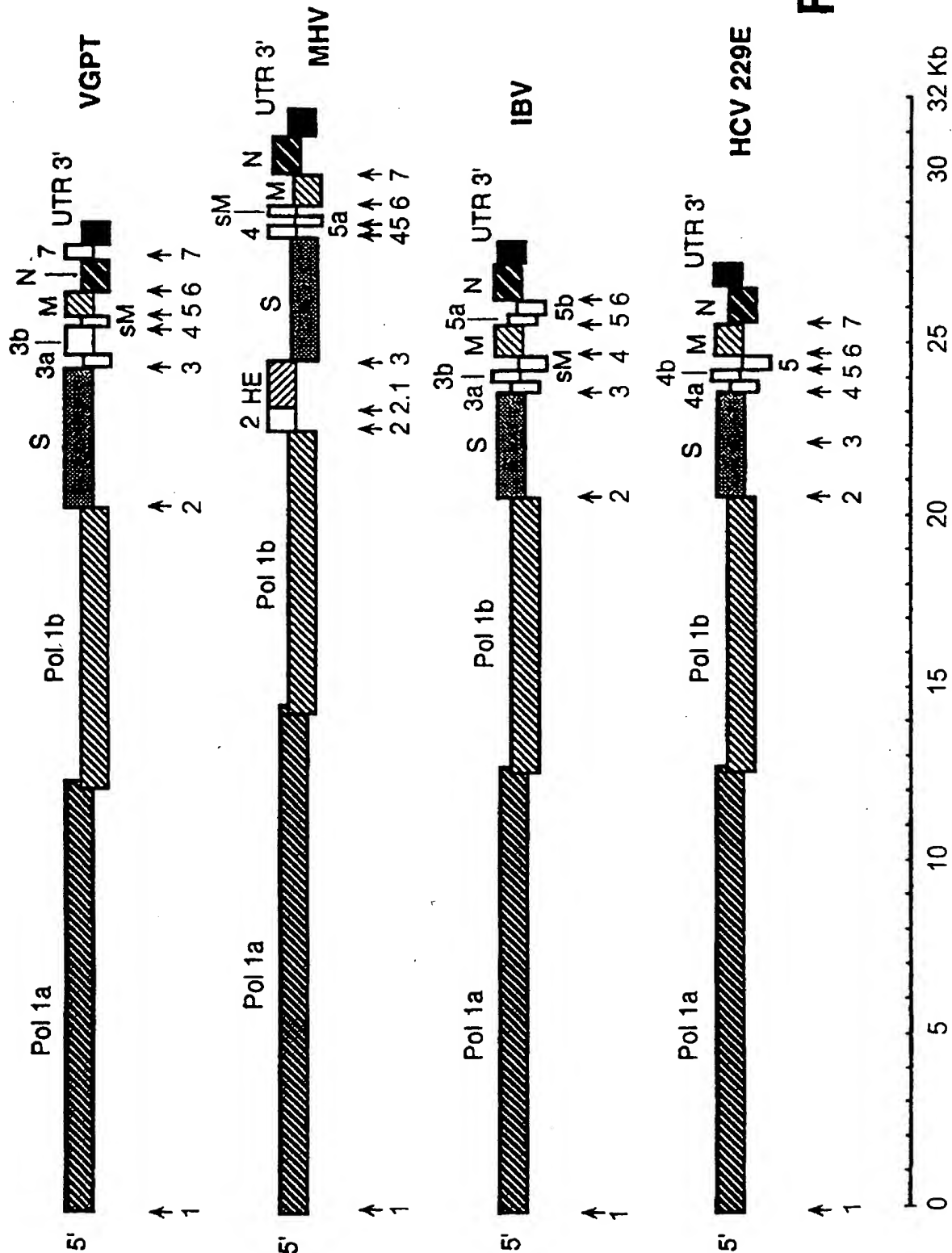
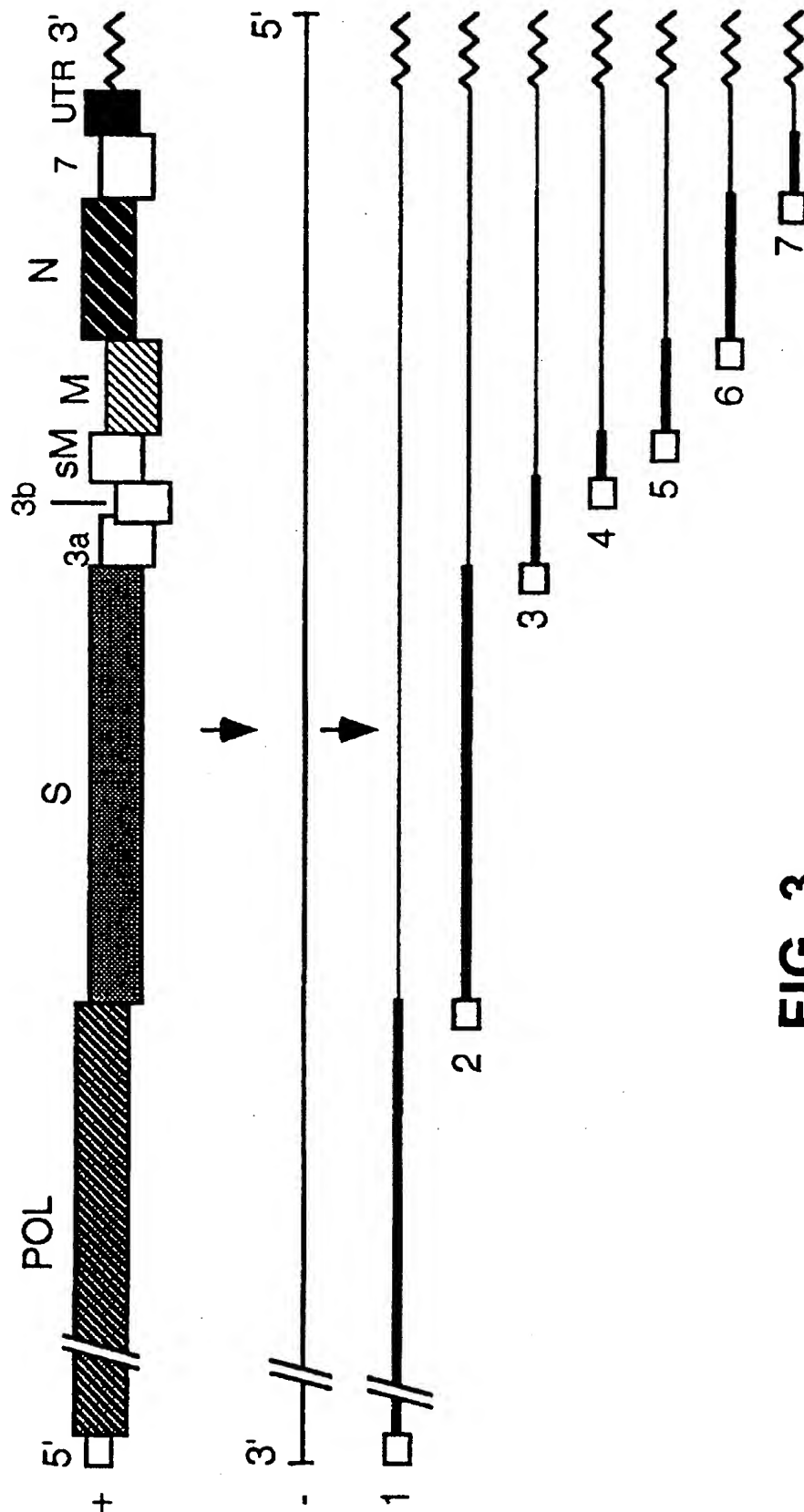


FIG. 2

3/27



HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

FIG. 3

4/27

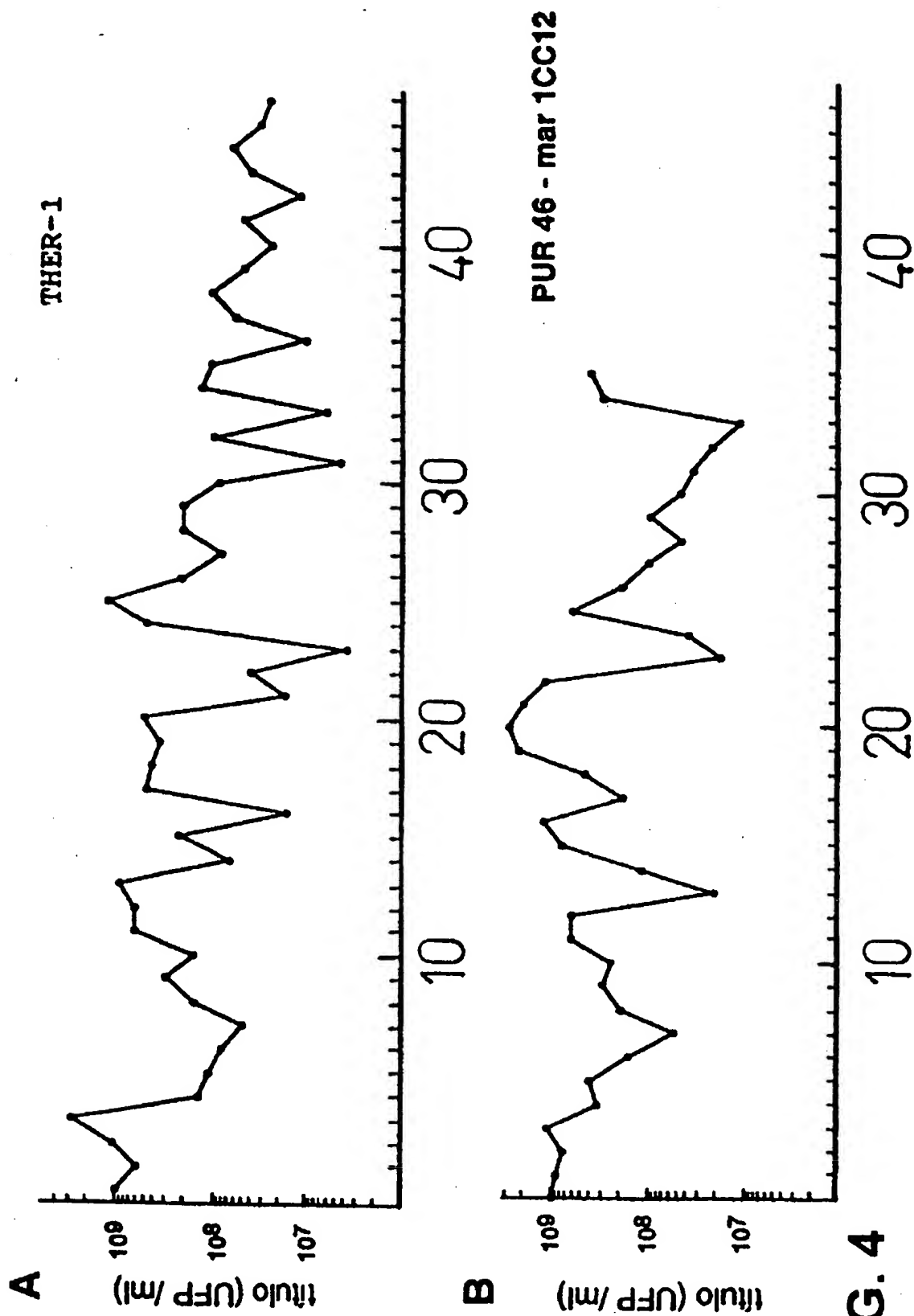


FIG. 4

5/27

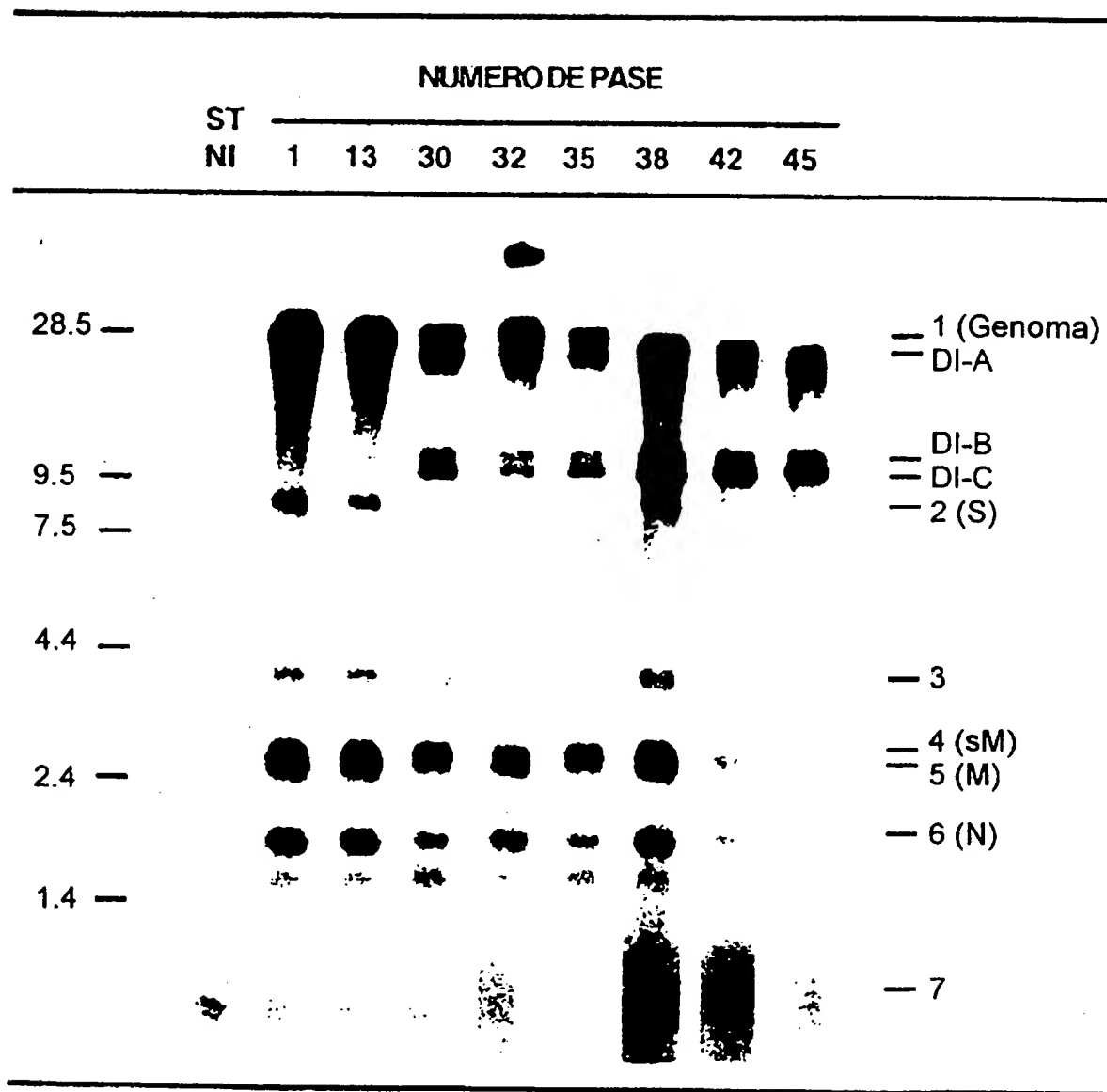


FIG. 5

6/27

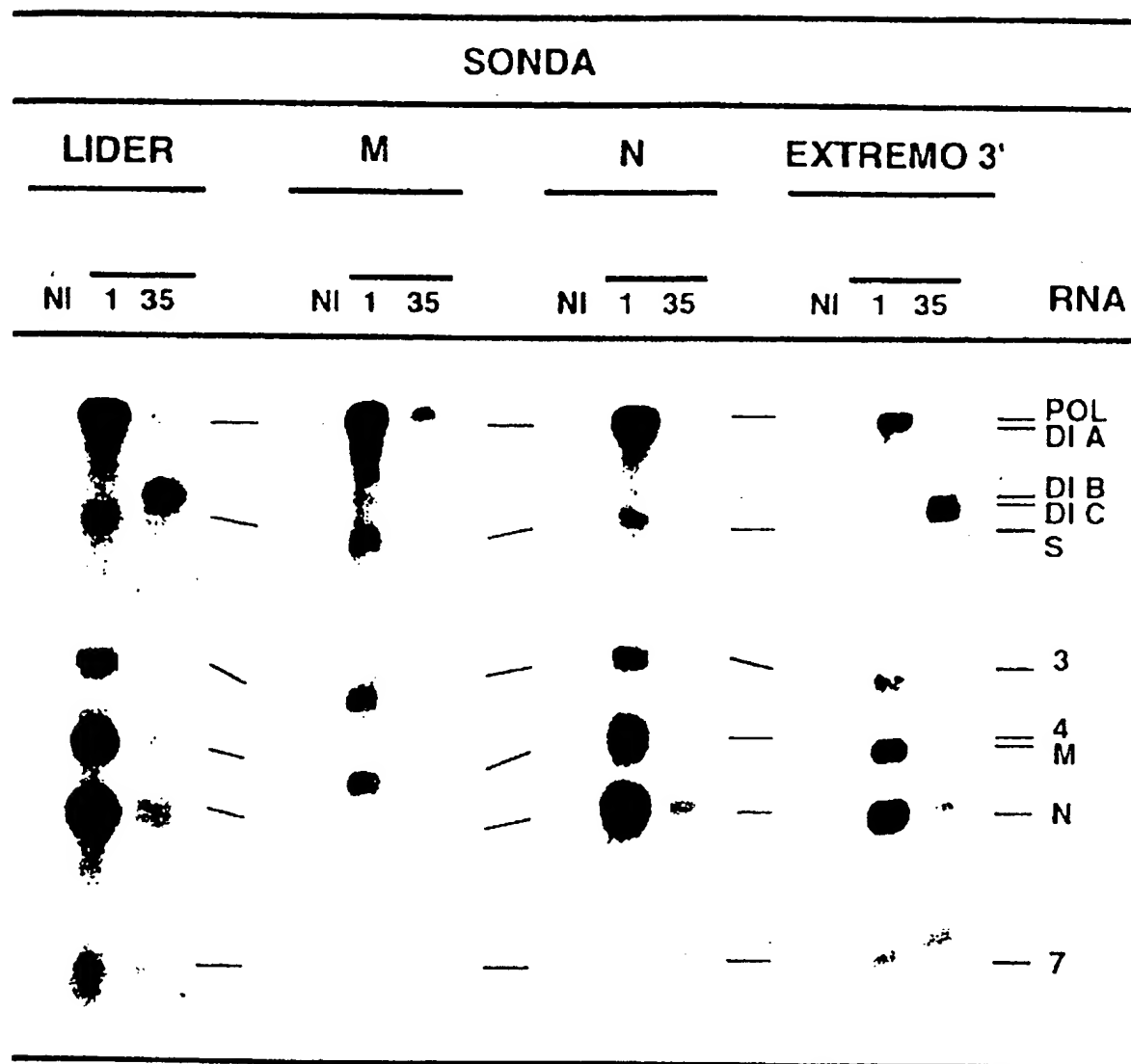
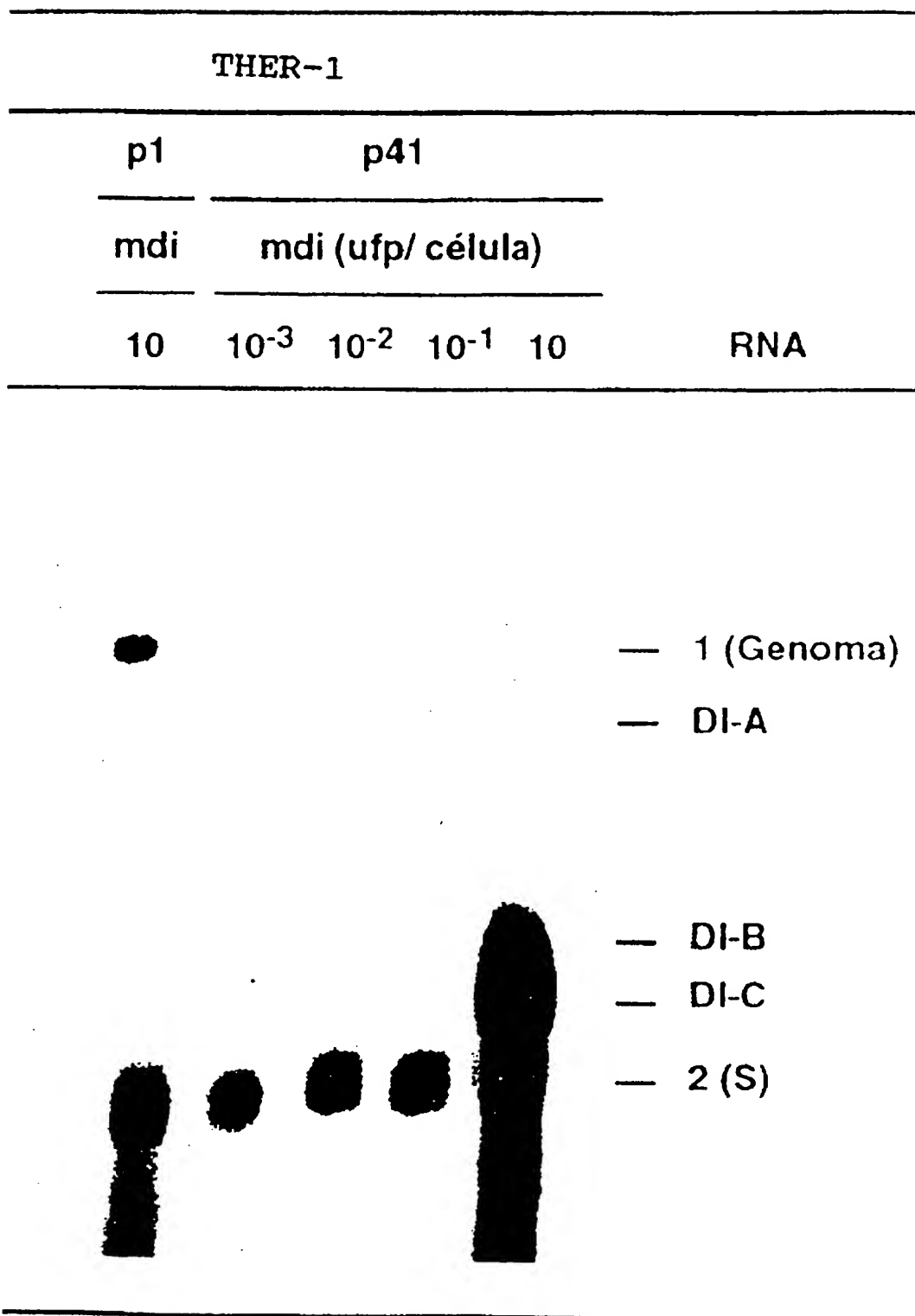


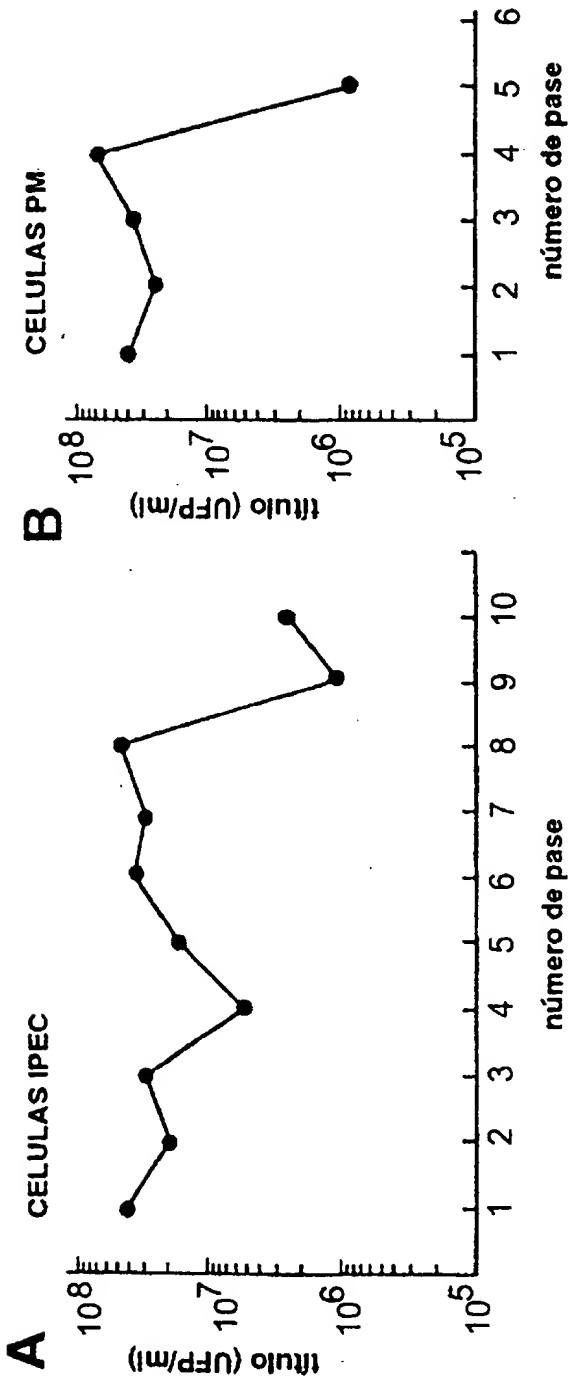
FIG. 6

7/27

**FIG.7**

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

8/27



THIR-1-STp46

| nº de pase en | | nº de pase en | |
|---------------|----|---------------|---|
| células IPEC | | células PM-2 | |
| 1 | 10 | 1 | 5 |
| RNA | | RNA | |

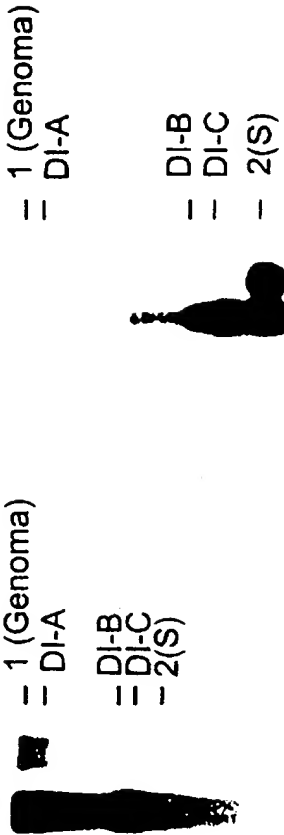


FIG.8

9/27

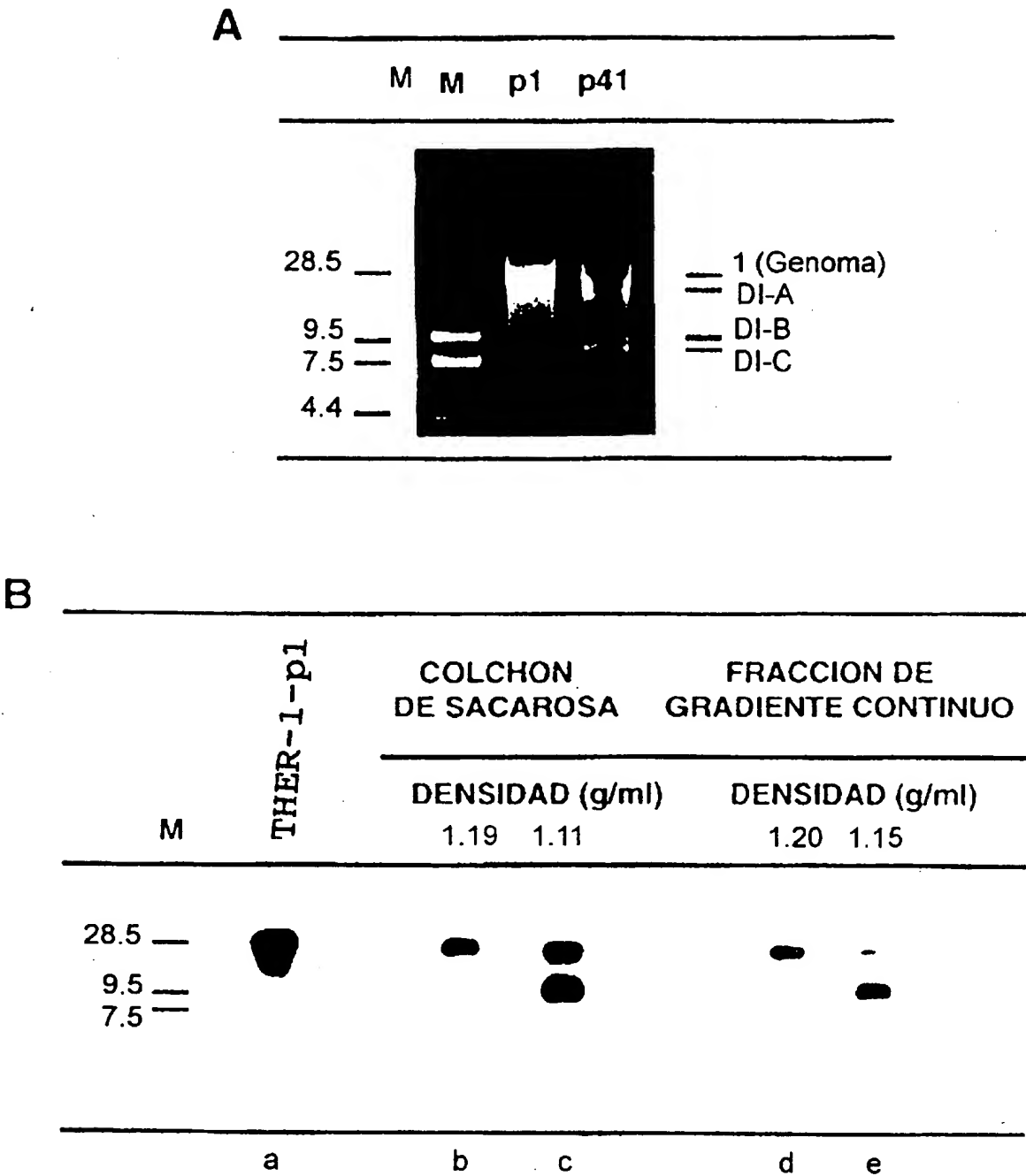
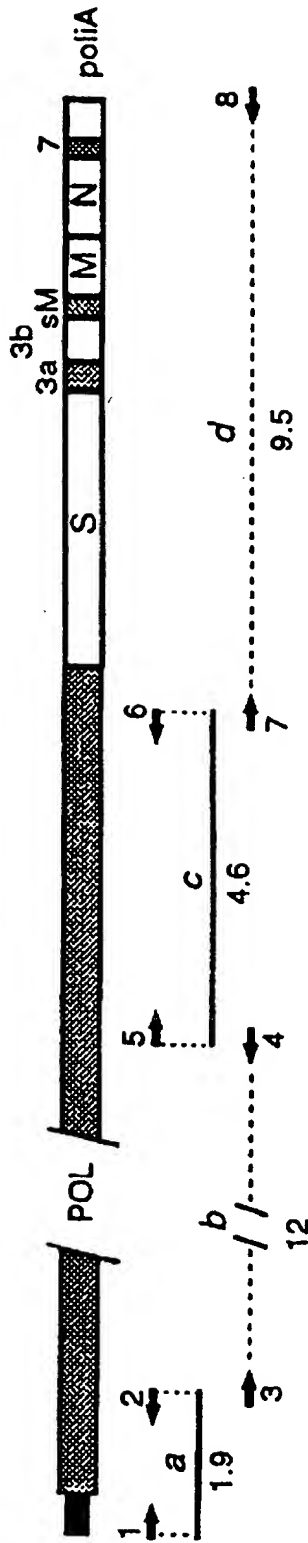


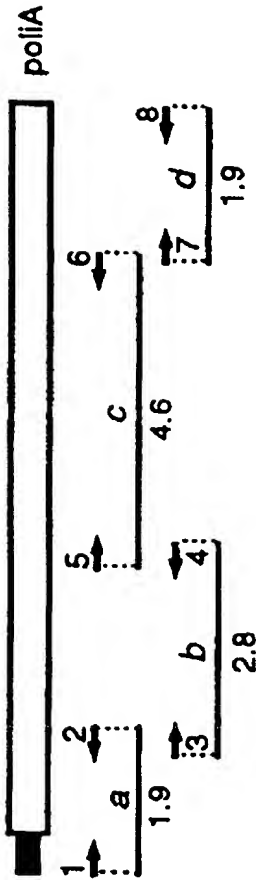
FIG.9

10/27

A RNA genómico (28.5 kb)



B DI-B (~10.6 kb)



C DI-C (9.7 kb)

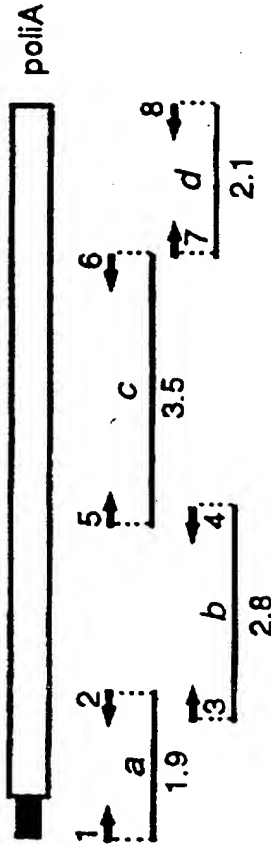


FIG.10

11/27

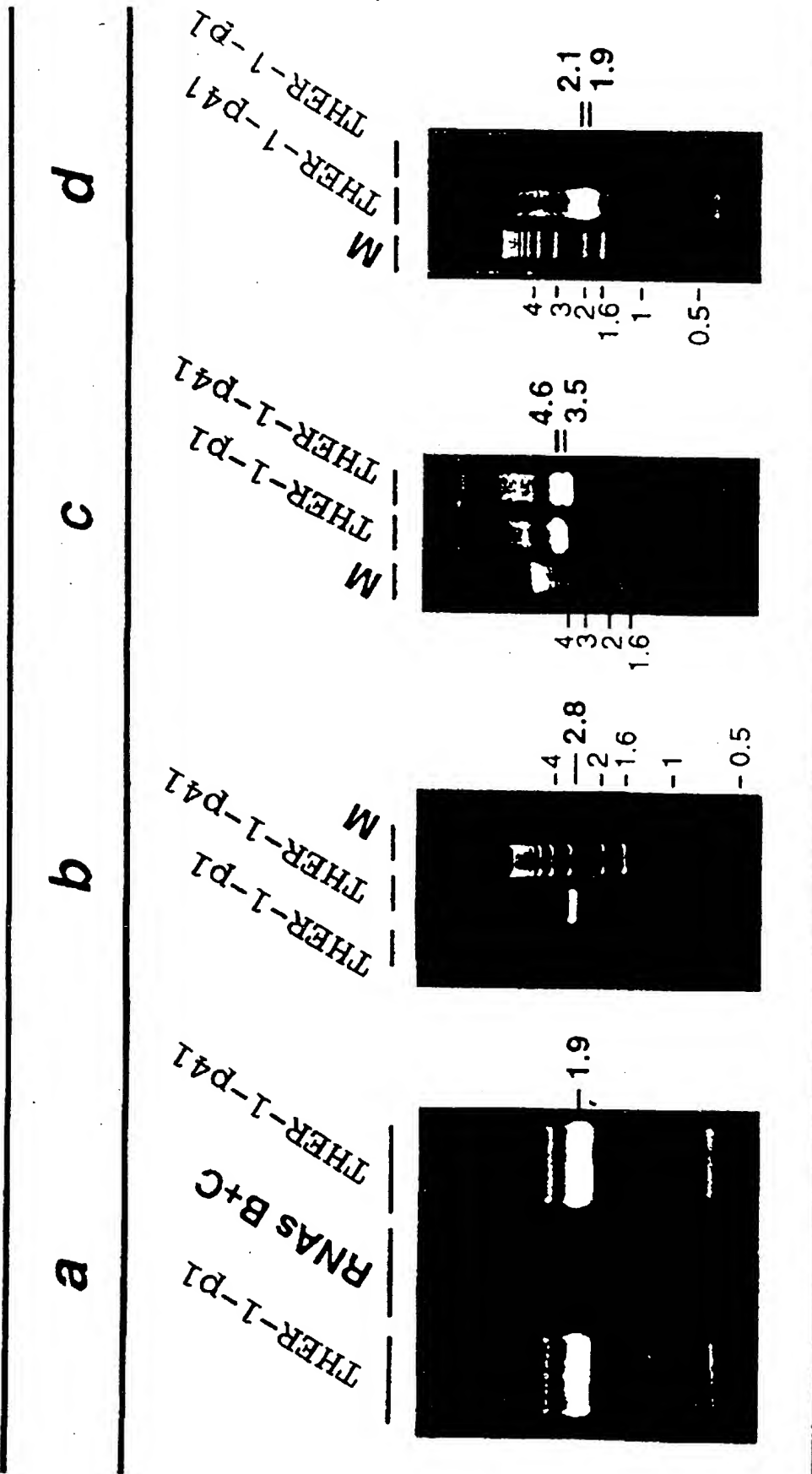


FIG.11

12/27

NCITTTAAAGTAAAGTGAGTGTAGCGTGGCTATATCTTCTTTTACTTTAACTAGCCTTGTGCTAGATTTTGTCTTCGGACACCAACTC 90

GAAGTAAAGTAAATATTGTCTTTCTATGAAATCATAGAGGACAAGCGTTGATTATTTCCATTGAGTTTGGCAATCACTCCTTGAACCG 180

M K S •

GCTTGACCGAACGGTGCAGTAGGGTCCGTCCTATTTGTAAGTCGCCTAGTAGACGAGTGGCGTCCGCGCGTACAACGTTGGGTA 270

GACCGGGTTCGCTCTGTGATCTCCCTCGCCGGCCGCCAGGAGAATGAGTTCCAAACAATTCAAGATCCTTGTTAATGAGGACTATCAAG 360

M S S K Q F K I L V N E D Y Q

TCAACGTGCCTAGTCTTCTATTGCTGACGTGTTACAGGAAATTAAGTACTGCTACCGTAATGCAATTTGAGGGCTATGTTTTGCTACCAG 450

V N V P S L P I R D V L Q E I K Y C Y R N G F E G Y V F V P
AATACTGTCTGACCTAGTTGATTGCCATCGTAAGGATCACTACGTCATTGGTGTCTTGGTAACGGAGTAAGTGATCTTAAACCTGTT 540

E Y C R D L V D C D R K D H Y V I G V L G N G V S D L K P V
TTCTTACCGAACCCCTCCGTCATGTTGCAAGGCTTTATTGTTAGAGCTAACTGCAATGGCGTTCTTGAGGACTTTGACCTTAAAATTGCTC 630

L L T E P S V H L Q G F I V R A N C N G V L E D F D L K I A
GCACTGTGAGAGTGCCATATATGTTGATCAATACATGTGTGGTGTGATGGAACCAGTCATTGAAGCGGATTTTAAGGACTACTTCG 720

R T V R G A I Y V D Q Y H C G A D G K P V I E G D F K D Y F
GTGATGAAGACATCATTGAATTTGAAGGAGAGGAGTACCATTGGCGTTGGACAACTGTCCCGATGAGAAACCGCTGAATCAGCAAACCTC 810

G D E D I I E F E G E E Y H C A W T T Y R D E K P L N Q Q T
TCTTACCATTGAGGAAATCCAATACAATCTGGACATTCCTATAAATTGCCAAACTGTGCTACTAGACATGTAGCACCACCAGTCAAAA 900

L F T I Q E I Q Y N L D I P H K L P N C A T R H V A P P V K

FIG. 12/1

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

13/27

AGAAGCTCTAAAATAGTTCTGTCTGAAGATTACAAGAAGCTTTATGATATCTTCGGATCACCCCTTTATGGGAAATGGTGACTGTCTTAGCA 990
K N S K I V L S E D Y K K L Y D I F G S P F H G N G D C L S
AATGCTTTGACACTCTTCATTTTATCGGTGCTACTCTTAGATGCCCGTGTGTTCTGAAAGTAGCGCGTTGGAGATTGGACTGCTTTTA 1080
K C F D T L H F I A A T L R C P C G S E S S G V G D W T C F
AGACTGCTGTGTGCTCTTTCTGGCAAAGTTAAGGGTGTCACTTTGGGTGATATTAAGCCTGGTGATGCTGTGTCACTAGTATGAGCG 1170
K T A C C G L S G K V K G V T L G D I K P G D A V V T S H S
CAGGTAAGGAGTTAAGTTCTTTGCCAATTGTGTTCTTCAATATGCTGGTGATGTTGAAGGTGTCTCCATCTGGAAGTTATTAAGAACTT 1260
A G K G V K F F A N C V L Q Y A G D V E G V S I W K V I K T
TTACAGTTGATGAGACTGTATGCACCCCTGGTTTTGAAGCGAATTGAACGACTTCATCAAACCTGAGAGCAAATCACTAGTTGCATGCA 1350
F T V D E T V C T P G F E G E L N D F I K P E S K S L V A C
CGGTTAAAGAGCATTCACTACTGCTGATATTGATGATGCTGTACATGATTGTATCATTACAGGAAAATTGGATCTTAGTACCAACCTTT 1440
S V K R A F I T G D I D D A V H D C I I T G K L D L S T N L
TTGGTAATGTTGGTCTATTATTCAAGAAGACTCCATGGTTTGTACAAAAGTGTGGTGCACTTTTTGTAGACGCTTGGAAAGTAGTAGAGG 1530
F G N V G L L F K K T P W F V Q K C G A L F V D A W K V V E
AGCTTTGTGGTTCACCTCACACTTACATACAAGCAAATTTATGAAGTTGTAGCATCACTTTGCACTTCTGCTTTTACGATTGTAAACTACA 1620
E L C G S L T L T Y K Q I Y E V V A S L C T S A F T I V N Y
AGCCAACATTTGTGGTTCAGACAATCGTGTAAAGATCTTGTAGACAAGTGTGTGAAAGTCTTGTAAAAGCATTGTGTTTTTACCG 1710
K P T F V V P D N R V K D L V D K C V K V L V K A F D V F T

FIG. 12/2

14/27

AGATTATCACAATAGCTGATTGAGGCCAAATGCTTTGCTGCTGGTGCTAAATACCTGTTGTTCAATAATGCACCTTGTCAAACTTGTCA 1800
 Q I I T I A G I E A K C F V L G A K Y L L F N N A L V K L V
 GTGTTAAATCCTTGCCAAGAAGCAAAGGGTCTTGAATGTGCATTCTTTGCTACTAGCTTGGTTGGTCCAACCTGTTAATGTGACACCTA 1890
 S V K I L G K K Q K G L E C A F F A T S L V G A T V N V T P
 AAAGAACAGAGACTGCCACTATCAGCTTGAACAAGGTTGATGATGTTGTAGCACCAGGAGAGGGTTATATCGTCATTGTTGGTGATATGG 1980
 K R T E T A T I S L N K V D D V V A P G E G Y I V I V G D M
 CTTTCTACAAGACTGGTGAATATTATTTTCATGATGTCTAGTCTTAATTTGTTCTTACTAACAATGTTTTTAAAGCAGTTAAAGTTCCAT 2070
 A F Y K S G E Y Y F H H S S P N F V L T N N V F K A V K V P
 CTTATGACATCGTTTATGATGTTGATAATGATACCAAAGCAAATGATTGCAAACTTGGTTCATCATTGAACAAATACCAACTGGCA 2160
 S Y D I V Y D V D N D T K S K M I A K L G S S F E Q I P T G
 CACAAGATCCAATTCCGTTCTGTATTGAAAATGAAGTTTGTCTGTCTGTGTTGTTGGCTTAACAATGGTTGCATGTCCGATCGTACTT 2250
 T Q D P ¹ R F C I E N E V C V V C G C W L N N G C M C D R T
 CTATCCAGAGTTTACTGTTGATCAAACTTATTAAAGCAGTCCGGCTTCTAGTGCAGCTCGACTAGAACCCCTGCAATGGTACTGATCC 2340
 • S K L F K R V R G S S A A R L E P C N G T D P
 S H Q S F T V D Q S Y L N E C G V L V Q L D •
 AGACCATGTTAGTAGAGCTTTTGACATCTACAACAAAGATGTTCCGTGATTGCTAAATTCCTTAAGACGAATTGTTCAAGATTTAGGAA 2430
 D H V S R A F D I Y N K D V A C I G K F L K T N C S R F R N
 TTTGGACAAACATGATGCCCTACTACATTGTCAAACGTTGTACAAAGACCGTTATGGACCATGAGCAAGTCTGTTATAACCATCTTAAAGA 2520
 L D K H D A Y Y I V K R C T K T V H D H E Q V C Y N D L K O

FIG. 12/3

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

15/27

TTCTGGTCTGTTGCTGAGCATCACTTCTTCACATATAAAGAGGGTAGATGTCAGTTCGGTAATGTTCCACGTAGCAATCTTACAAAGTA 2610
S G A V A E H D F F T Y K E G R C E F G N V A R R N L T K Y

CACAATGATGGATCTTTGTTACGCTATCAGAAATTTTCATGAAAAGAACTGTGAAGTTCTCAAAGAAATACTCGTCACAGTAGCTGCTTG 2700
T H N D L C Y A I R N F D E K N C E V L K E I L V T Y G A C

CACTGAAGAATTCTTTGAAAATAAGATTGGTTTGATCCAGTTGAAAATGAAGCCATACATGAAGTTTATGCAAAACTTGGACCCATTCT 2790
T E E F F E N K D W F D P V E N E A I H E V Y A K L G P I V

AGCCAATGCTATGCTTAAATGCTGTTGCTTTTTGCGATCGCATAGTGGAAAAAGCTATATAGGTGTTATAACACTTGACAACCAAGATCT 2880
A N A M L K C V A F C D A I V E K G Y I G V I T L D N O D L

TAATGGCAATTTCTACGATTTCCGGGATTTGCTGAAGACTGCTCCGGGTTTTGCTTGGCETTGTGTTACATCATATTATCTTATATGAT 2970
N G N F Y D F G D F V K T A P G F G C A C Y T S Y Y S Y M H

GCCTTTAATGGGATCACTTCATGCTTAGACTCTGAAAACCTTGTGAAAAGTGACATCTATGCTTCTGATTATAAGCACTATCATTTACT 3060
P L M G H T S C L E S E N F V K S D I Y G S D Y K O Y D L L

AGCTTATGATTTTACCGAACATAAGGAGTACCTTTTCCAAAAATACTTTAAGTACTGGCATCGCACATATCACCCAAATTGTTCTGATTG 3150
A Y D F T E H K E Y L F Q K Y F K Y W D R T Y H P N C S D C

TACTAGTGACGAGTGTATTATTCATTGTGCTAATTTTAACACATTGTTTTCTATGACAATACCAATGACAGCTTTTGGACCACTTGTCCG 3240
T S D E C I I H C A N F N T L F S M T I P M T A F G P L V R

TAAAGTTCATATTGATGGTGTACCAGTAGTTGTTACTGCAGGTTACCATTTCAAACAACCTGGTATAGTATGGAATCTTGATGTAAAATT 3330
K V H I D G V P V V V T A G Y H F K O L G I V W N L D Y K L

AGACACAATGAAGTTGAGCATCACTGATCTTCTTAGATTGTCACAGATCCAACACTTCTTGTAGCATCAAGCCCTGCACCTTTTAGACCA 3420
D T M K L S M T D L L R F V T D P T L L V A S S P A L L D Q

FIG. 12/4

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

16/27

CGTACTGTCTGTTTCTCCATTGCAGCTTTGAGTACTGGTATTACATATCAGACAGTAAACCAGGTCACITTAACAAGGATTTCTACGA 3510
R T V C F S I A A L S T G I T Y Q T V K P G H F N K D F Y D

TTTCATAACAGAGCGTGCATTCTTTGAAGAGGGATCTGAGTTAACATTAAACATTTTTCTTTGCACAGGGTGGTGAAGCTGCTATGAC 3600
F I T E R G F F E E G S E L T L K H F F F A Q G C E A A M T

AGACTTCAATTATTATCGCTACAATAGAGTCACAGTACTTGATATTTGCCAAGCTCAATTTGTTTACAAAATAGTTGCCAAGTATTTTGA 3690
D F N Y Y R Y N R V T V L D I C Q A Q F V Y K I V G K Y F E

ATGTTATGACGGTGGGTGCATTAATGCTCGTGAAGTGTGTTACAACTATGACAAGAGTGGCTATCCTTTGAACAAATTTGGTAA 3780
C Y D G G C I N A R E V V V T N Y D K S A G Y P L N K F G K

AGCTAGACTTTACTACGAACTCTTTTCATATGAAGAGCAGGATGCACITTTTGCTTTAACAAGACAAATGTTTACCCACAATGACTCA 3870
A R L Y Y E T L S Y E E Q D A L F A L I K R N Y L P T R T Q

AATCAATTTGAAATACGCTATTTCTGGTAAGGCAAGAGCTCGTACAGTAGGAGGAGTTTCACTTCTTTCTACCATGACTACCAGACAATA 3960
M N L K Y A I S C K A R A R T V G G Y S L L S Y N T I R Q Y

TCATCAGAAGCATTTGAAGTCAATTGCTGCAACACGCAATGCTACTGTGCTCATTGGTTCAACCAAGTTTTATGCTGCTTGGCACAATAT 4050
H Q K H L K S I A A T R N A T Y V Y I C S T K F Y G C W D N H

GCTTAAAAATTTAATGCGTGATCTTGATAATGCTTGTTCATGGCATGGGACTATCCTAAGTGTGACCGTGCTTTACCTAATATGATTAG 4140
L K N I H R O Y D N C C L H G V D Y P K C D R A L P N H I R

AATGGCTTCTGCCATGATATTAGGTTCTAAGCATGTTGCTTGTGTACACATAATCATAGGTTCTACCGCTCTCCAATGAGTTAGCTCA 4230
M A S A N I C C S K N Y G C C T H N D R F Y R L S N E I A Q

FIG. 12/5

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

17/27

AGTACTCACAGAAGTTGTGCATTGCACAGGTGGTTTTATTTAAACCTGGTGGTACAACAGCGGTGATGCTACTACAGCATATGCTAA 4320

Y L T E V V H C T G G T Y F K P G G T T S G O C T T A Y A K

CTCTGCTTTTAACATCTTTCAAGCTGTTTCTGCTAATGTTAATAAGCTTTTGGGGCTTGATTCAAACGCTTGAACAACGTTACAGTAA 4410

S A F H I F G A V S A H V N K L L G Y D S H A E V N Y T Y K

ATCCATACAACGTAAAATTTACCATAATTGTTATCGTAGTAGCAGCATTGATGAAGAATTTGTTGTTGACTACTTTAGTTATTTGAGAAA 4500

S I D R K I Y D N E Y P S S S I D E E F V Y E Y F S Y L R K

ACACTTTTCTATGATGATTTTATCTGATGATGGAGTTGTGTGCTACAACAAAGATTATGCCGATTTAGGTTATGTAGCTGACATTAATGC 4590

H F S H H I L S D D G V Y E Y N K D Y A D L G Y V A D I N A

POLIMERASA

TTTTAAAGCAACACTTTATTACCAGAATAACGTCTTTATGTCCACTTCTAAGTGTGGGTAGAACCAGATCTTAGTGTGGACCACATGA 4680

F K A T L Y Y Q N N V F H S T S K C W V E P D L S Y C P H E

ATTTGTTACAGCATACATTGCAGATTGTTGGCCCTGATGGAGACTACTATCTCCCTATCCAGACCCGTCAGAAATTTGTCAGCTGG 4770

F C S D H T L Q I V R P D G D Y Y L P Y P D P S R I L S A G

TGTGTTTGTGATGACATAGTTAAACAGACAATGTTATTATGTTAGAAGCTTACGTGTGCTATTGACGCATACCCGCTCACAAA 4860

V F V D D I V K T D N V I H L E R Y V S L A I D A Y P L T K

ACACCCTAAGCCTGCTTATCAAAAAGTGTTTTAACTCTACTAGATTGGGTTAAACATCTACAGAAAAATTTGAATGCAGGTGTTCTTGA 4950

H P K P A Y Q K V F Y T L L D W V K H L Q K N L N A G V L D

TTCGTTTTCAGTGACAATGTTAGAGGAAGGTCAAGATAAGTTCTCGAGTGAAGAGTTTACGCTAGCCTCTATGAAAAGTCCACTGCTT 5040

S F S V T H L E E G Q D K F V S E E F Y A S L Y E K S T V L

DEDOS DE ZINC

GCAAGCTGCAGGCATGTGTGTAGTATGTGGTTCCAAACTGTACTTCGTTGTGGAGACTGTCTTAGGAGACCACTTTTATGCACGAAATG 5130

Q A A G H E V Y E G S Q T V L R C Q D E L R R P L L C T K C

FIG. 12/6

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

18/27

TGCTTACGACCATGTTATGGGAACAAAGCATAAATTCATTATGCTATCACACCATATGCTGTAGTTTAAATGGTTGTAATGTCAATGA 5220

A Y D H V N G I K H K F I H S I T P Y V C S F N G C N V N D

DEDOS DE ZINC

TGTTACAAAGTTGTTTTAGGTGGTCTTAGTTATTATTGTATGAACCACAAACCACAGTTGTCATTCCCACTCTGTGCTAATGGCAACGT 5310

V T K L F L G G L S Y Y C H N H K P Q L S F P L C A N G N V

TTTTGGTCTATATAAAAGTAGTGCAGTCGGCTCAGAGGCTGTTGAAGATTTCAACAAACTTGCAGTTTCTGACTGCGCTAATGTAGAAGA 5400

F G L Y K S S A V G S E A V E D F N K L A V S D W T N V E D

CTACAAACTTGCTAACAATGTCAAGGAATCTCTGAAAATTTTCGCTGCTGAACTGTGAAAGCTAAGGAGGAGTCTGTTAAATCTGAATA 5490

Y K L A N N V K E S L K I F A A E T V K A K E E S V K S E Y

TGCTTATGCTGTATTAAGGAGGTTATCGGCCCTAAGGAAATGTACTCCAATGGGAAGCTTCTAAGACTAAGCCTCCACTTAACAGAAA 5580

A Y A V L K E V I G P K E I V L W E A S K T K P P L N R H

TTCAGTTTTACGCTGTTTTACATAAGTAAGGATACTAAAATTCATTAGGTGAATTTGCTTTGACCAATCTGAGTACCGTAGTGATTC 5670

S V F T C F Q I S K D T K I Q L G E F V F E D S E Y G S D S

TGTTTATTACAAGAGCAGGAGTACTTACAAATGACACCAGGTATGATTTTGTGTTGACTTCTCATAATGTGAGTCTCTTAAAGCTCC 5760

V Y Y K S T S T Y K L T P G H I F V L T S H N V S P L K A P

AATTTTAGTCAACCAAGAAAAGTACAATACCATATCTAAGCTCTATCCTGTCTTTAATATAGCGAGGCCTATAATACACTGGTTCTTA 5850

I L V N Q E K Y N T I S K L Y P V F N I A E A Y N T L V P Y

CTACCAATGATAGGTAAGCAAAAATTTACAACATCCAAGGTCCTCCTGCTAGCGGTAATCTCATTGCTTATAGGTTTGGCTTTGTA 5940

Y D H T G K Q K F T T I D G P P C S G K S H C Y I G L G L Y

HELICASA

FIG. 12/7

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

19/27

TTACCCCTCAGGCGACAATAGTCTACACTGCATGTTCTCATGCGGCTGTAGACGCTTTATGTGAAAAAGCAGCCAAAACTTCAATGTTGA 6030

Y P G A R I V Y T A C S H A A V D A L C E K A A K N F N Y D

TAGATGTTCAAGGATAATACCTCAAAGAATCAGAGTTGATTGTTACACAGGCTTTAAGCCTAATAACACCAATGCGCAGTACTTGTGTTG 6120

R E S R I I P Q R I R V D C Y T G F K P W N T W A D Y L F C

TACTGTTAATGCTCTACCAGAAGCAAGTTGTGACATTGTTGTAGTTGATGAGCTCTCTATGTGTACTAATTATGATCTTAGTGTCTATAA 6210

T V N A L P E A S C D I V V V D E V S H C T N Y D L S V I N

TAGCCGACTGAGTTACAAACATATTGTTTATGTTGGAGACCCACAGCAGCTACCAGCTCCTAGAAGCTTTGATTATAAGGCTGTACTTCA 6300

S R L S Y K H I V Y V G D P Q Q L P A P R T L I N K G V L Q

ACCGCAGGATTACAATGTTGTAACCAAAAGAATGTGCACACTAGGACCTGATGCTTTTTGCATAAATGTTACAGGTGCCAGCTGAAAT 6390

P Q D Y N V V T K R M C T L G P D V F L H K C Y R C P A E I

TGTTAAACAGTCTCTGCACTTGTGTTATGAAAATAAATTTGTACCTGTCAACCCAGAATCAAAGCAGTGTCTCAAATGTTTGTAAAAGG 6480

V K T V S A L V Y E N K F V P V N P E S K Q C F K H F V K G

TCAGATTGAGTTGAGTCTAACTCTTCTATAAACAACAAGCAACTAGAGTTGTCAAGGCCTTTTTAGCACATAATCCAAATGCCGTAA 6570

Q I Q I E S N S S I N N K Q L E V V K A F L A H N P K W R K

AGCTGTTTCATCTCACCTATAATAGTCAAAATTATGTTGCTCGGCGTCTTCTGGTTTGCAAACGCAAACTGTGGATTCCGCTCAGGG 6660

A V F I S P Y N S Q N Y V A R R L L G L Q T Q T V D S A Q G

TAGTGAGTATGATTACGTCACTAGCTGCTCTGAAGATTTTAACTCTGCTGCAATTCACGATGTGGTAATCCAAAAGGCATCCGTTGT 6750

S E Y D Y V I .

II ← I → III

GCTACAACACCAATACCATGGTTTTGTTATGATCGTGATCCTATTATAAACAATGTTAGATGCTGGATTATCACTATATGCTACATGCT 6840

FIG. 12/8

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

20/27

CAATGAATGGTCTTATGTTATTTGGAAGTGAATGTAGACATGTACCCAGAGTTTTCAATTGTTTGTAGATTGATACTCGCACTCGC 6930
TCTAAATTGTCTTTAGAAGGTTGTAATGGTGGTGCATTGTATGTTAATAACCATGCTTTCCACACACCAGCTTATGATAGAAGAGCTTTT 7020
GCTAAGCTTAAACCTATGCCATTCTTTACTATGATGATAGTAATTGTGAACCTGTTGATGGCAACCTAATTATGTACCACTTAAGTCA 7110
AATGTTTGCATAACAAAATGCAACATTGGTGGTGTCTGTGCAAGAAGCATGCTGCTCTTACAGAGCCTATGTTGAGGATTACAACATT 7200
TTTATGCAGGCTGGTTTTACAATATGGTGTCTCTCAAACTTTGACACCTATATGCTTTGCCATGGTTTTGTTAATAGCAAAGCACITCAG 7290
AGTCTAGAAAATGTGGCTTTTAAATGTCGTTAAGAAAGGTGCCTTCACCGGTTTAAAAGGTGACTTACCAACTGCTGTTATTGCTGACAAA 7380
ATAATGGTAAGAGATGGCCTACTGACAAATGTATTTTACAAATAAGACTAGTTTACCTACAAATGTAGCTTTTGAGTTATATGCAAAA 7470
CGCAAACCTGGACTCACACCTCCATTAACAATACTTAGGAATTTAGGTGTTGTCGCAACATATAAGTTTGTGTTGTTGGGATTATGAAGCT 7560
GAACGTCTTTCTCAAATTTCACTAAGCAAGTGTGTTCTACACTGATCTTGATAGTGAAGTTGTAACATGTTTTGATAATAGTATTGCT 7650
GGCTCTTTTGAGCGTTTTACTACTACAAGACATGCAGTCTTATTTCTAATAACGCTGTCAAAGGGCTTAGTCCATTAAATTACAATAT 7740
GGCTTTTGAATGATCTACCTGTAAGTACTGTTGGAATAAACCTGTCACATGCTATATCTATGTCGCAAGAATGCTGAGTACGTGCA 7830
CAAATCGATAGTTACTATACACAGGAGCTACTTTTGAACCTTCAAACCTCGTAGTACAATGGAAGAAGATTTTCTTAGTATGGATACT 7920
ACACTCTTCATCCAAAAGTATGGTCTTGAGGATTATGGTTTTGAACAGTGTATTTGGAGATGTCTCTAAAACTACCATTGCTGCTATG 8010
CATCTTCTTATATCGCAAGTCCGCTTGCAAAAATGGGTTTGTGTTTCCGTTCAAGAATTATGAATAATTCTGACAGTACACTGAAAAGT 8100
TGTGTATTACATATGCTGATGATCCATCTTCTAAGAATGTGTGCACCTATATGACATACTCTTGACGATTTTGTGACTATCATTAAG 8190
AGCTTAGATCTTAATGTGTGTCGCAAGTGTGGATGTCATTGTAGATTGTAAGGCATGGAGATGGATGTTGTTGGTGTGACAATTCACAT 8280
ATTAAACCTTCTATCCACAACCTCAATCTGCTGAATGGAATCCCGCTATAGCATGCCTACACTGTACAAAATCCAGCGTATGTGCTC 8370
GAACGGTGAATCTCTACAATTATGGTGCACAAGTGAATTAACCTGATGGCATTACTACTAATGTGTTAAGTATACTCAGTTGTGCTCA 8460
TACCTTAACACTACTACATTGTGTGTACCACACAAAAATGCGTATTGCAATTTAGGAGCTGCTGGTGCATCTGGTGTGCTCTCTGCTAGT 8550
ACTGTATTAAGAAGATGGTTACCAGATGATGCCATATTGGTTGATAATCATTTGAGAGATTACGTTTCCGACGCAGACTTCAGTGTACA 8640

FIG. 12/9

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

21/27

CGTGATTGCTACTAGTCTTTACATCGAAGACAAGTTTGATTGCTCGTCTCTGATTATATGATGGCTCCACAAAATCAATTGACGGTGAA 8730
AACACGTCGAAAGATGGTTTCTTTACTTATATTAATGGTTTCATTAAAGAGAAACTGTCACCTTGGTGGATCTGTTGCCATTAAATCACC 8820
GAATTTAGTTGGAATAAGATTTATATGAATTGATTCAAAGATTGAGTATTGGACTGTGTTTTGTACAAGTGTTAACACGTCATCATCA 8910
GAAGGCTTTCTGATTGCTATTAACACTTAGGACCATACTGTGACAAAGCAATAGTAGATGGAATATAATGCATGCCAATTATATATT 9000
TGGAGAACTCTACAATTATGGCTCTATCACATAACTCAGTCTAGACACTCCTAAATTCAAGTGTGTTGTAACAACGCACCTTATTGTT 9090
AATTTAAAGAAAAAGAATTGAATCAAATGGTCATTGGATTACTAAGGAAGGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGCTAAGTTACTAAAC 9180
TTTGCTAACCACTTCGTTAACACACCGATGAAAAATGCTGTATTATTACAGTTTTAATCTTACTACTAATTGCTAGACTCCAATTATTA 9270
III ←+→ IV
 H K K C C I Y Y S F N L T T N W .

GAAAGACTATTACTTAATCACTCTTTCAATCTTAAACTGTCAATGACTTTAATATCTTATATAGGAGTTTAGCAGAAACCAGATTACTA 9360
AAAGTGGTGCTTCGAGTAATCTTTCTAGTCTTACTAGGATTTTGTGCTACAGATTGTTAGTCACATTAATGTAAGGCAACCCGATGTCT 9450
AAAAGTGGTTTTTCCGAGGAATTACTGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGCTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACC 9540
CTATTGCATATTAGGAAGTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACA 9630
ATGGAAGAGCTAACGCTGGATCTAGTGATTGTTTAAATGTAAATTTGTTGAAAATTTTCCTTTTGATAGTGATACAAAAA 9714

FIG. 12/10

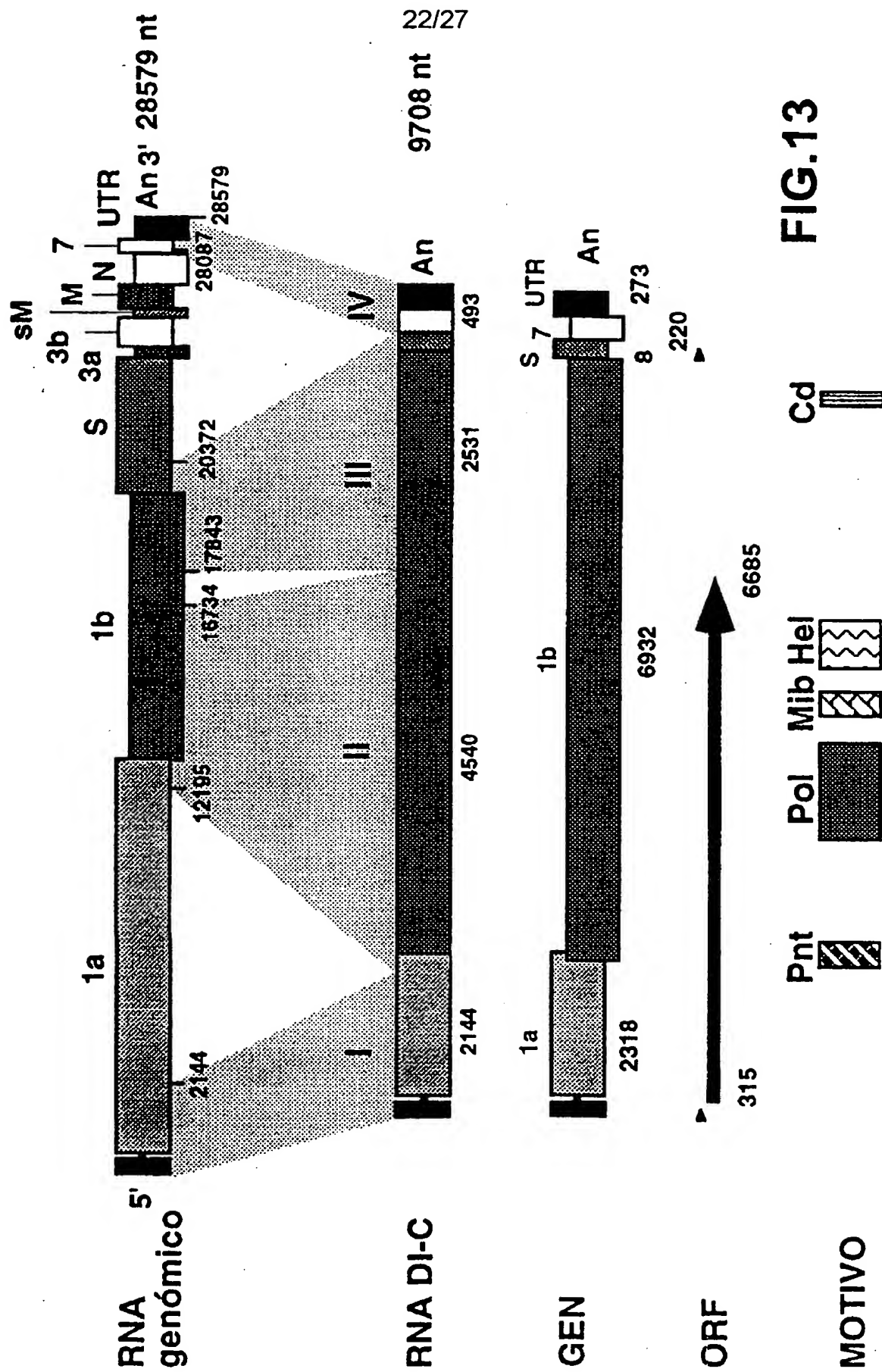


FIG.13

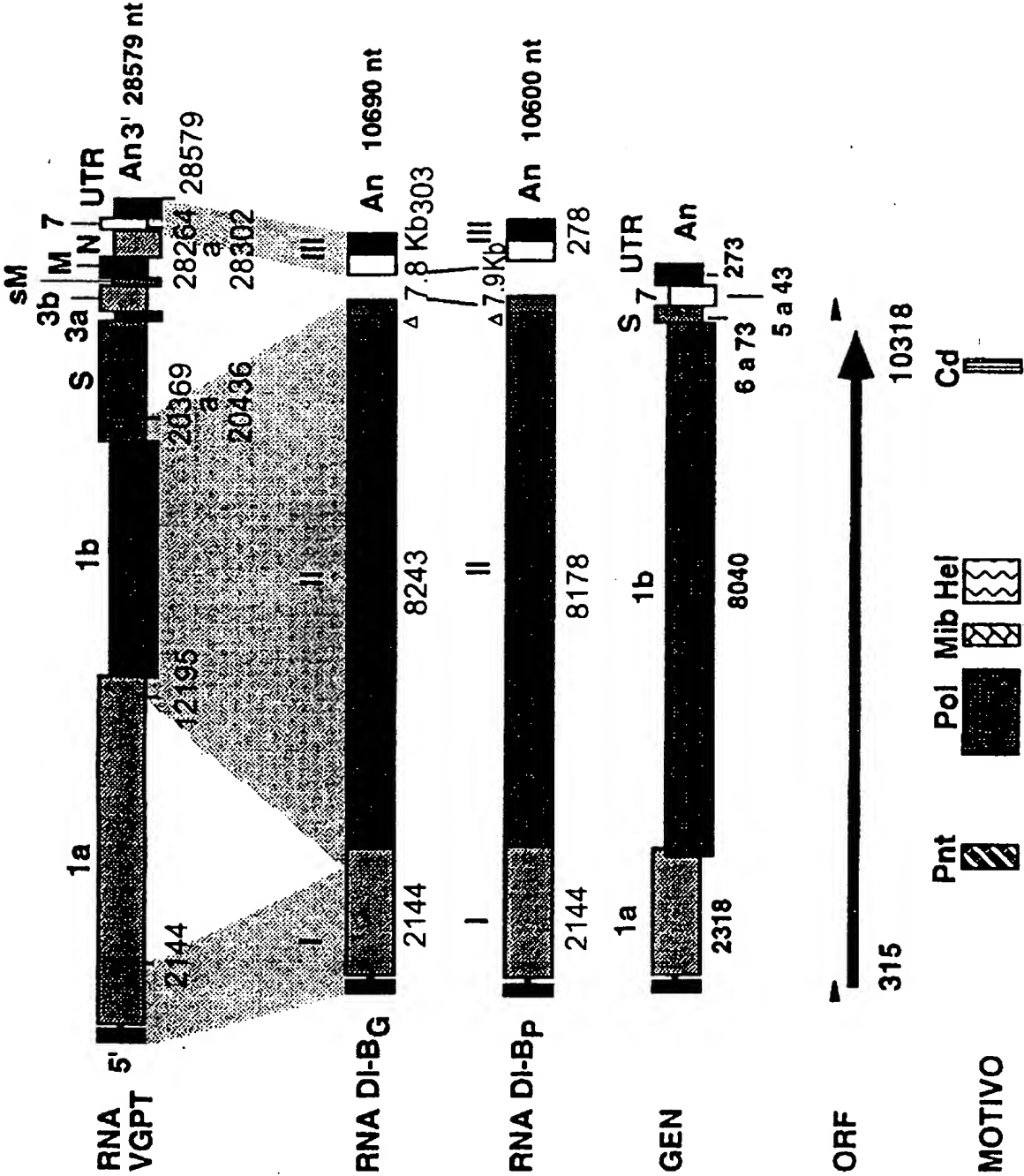
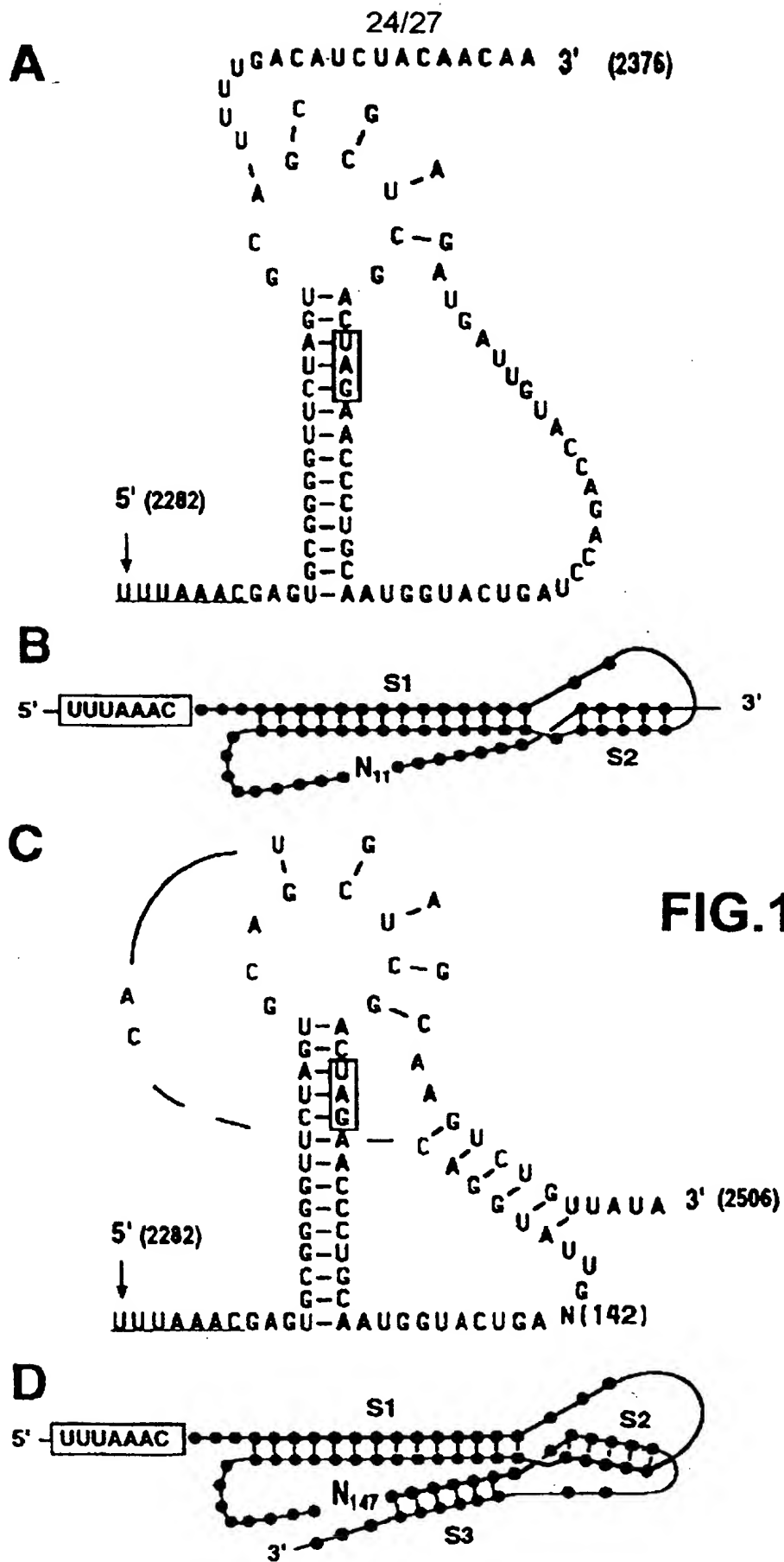


FIG.14



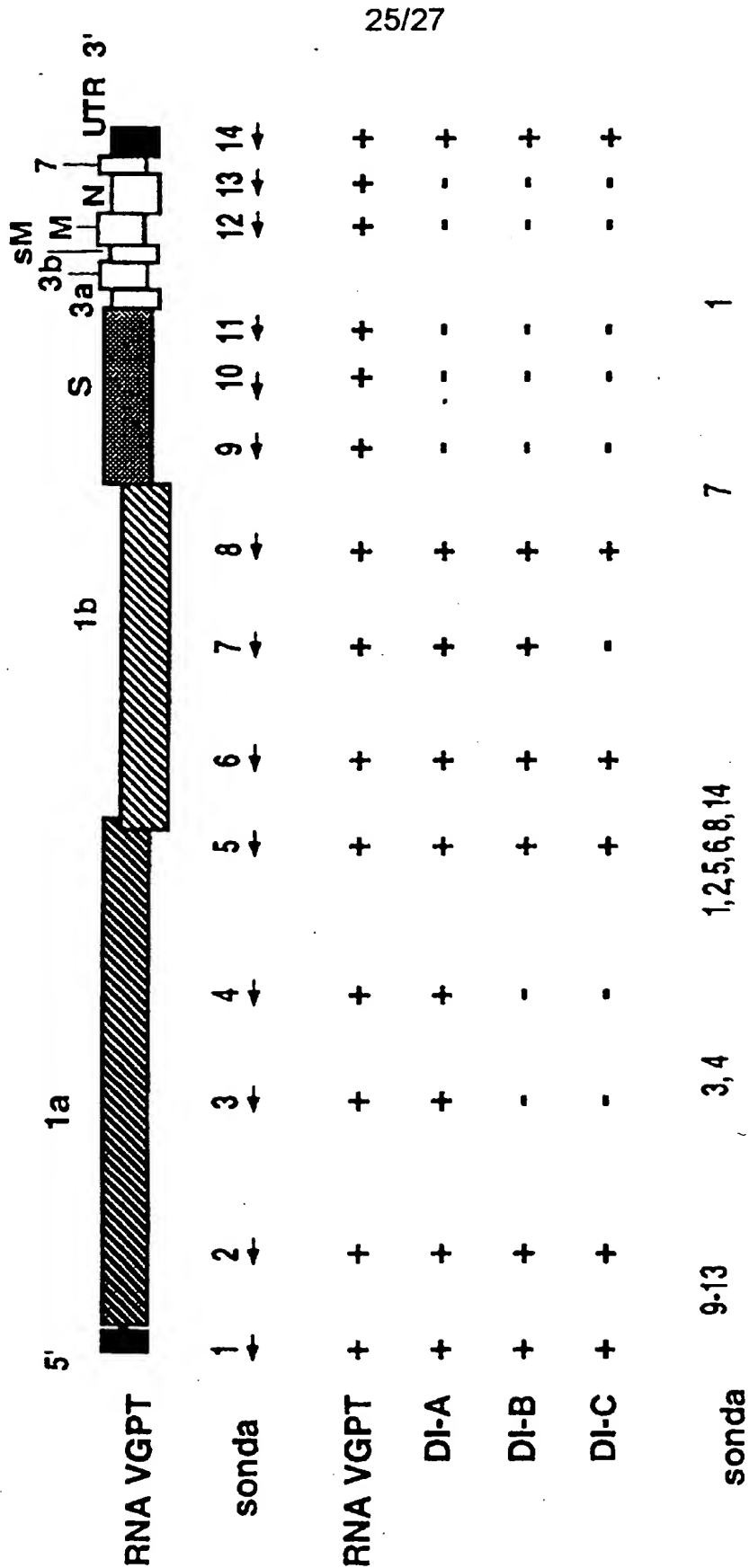
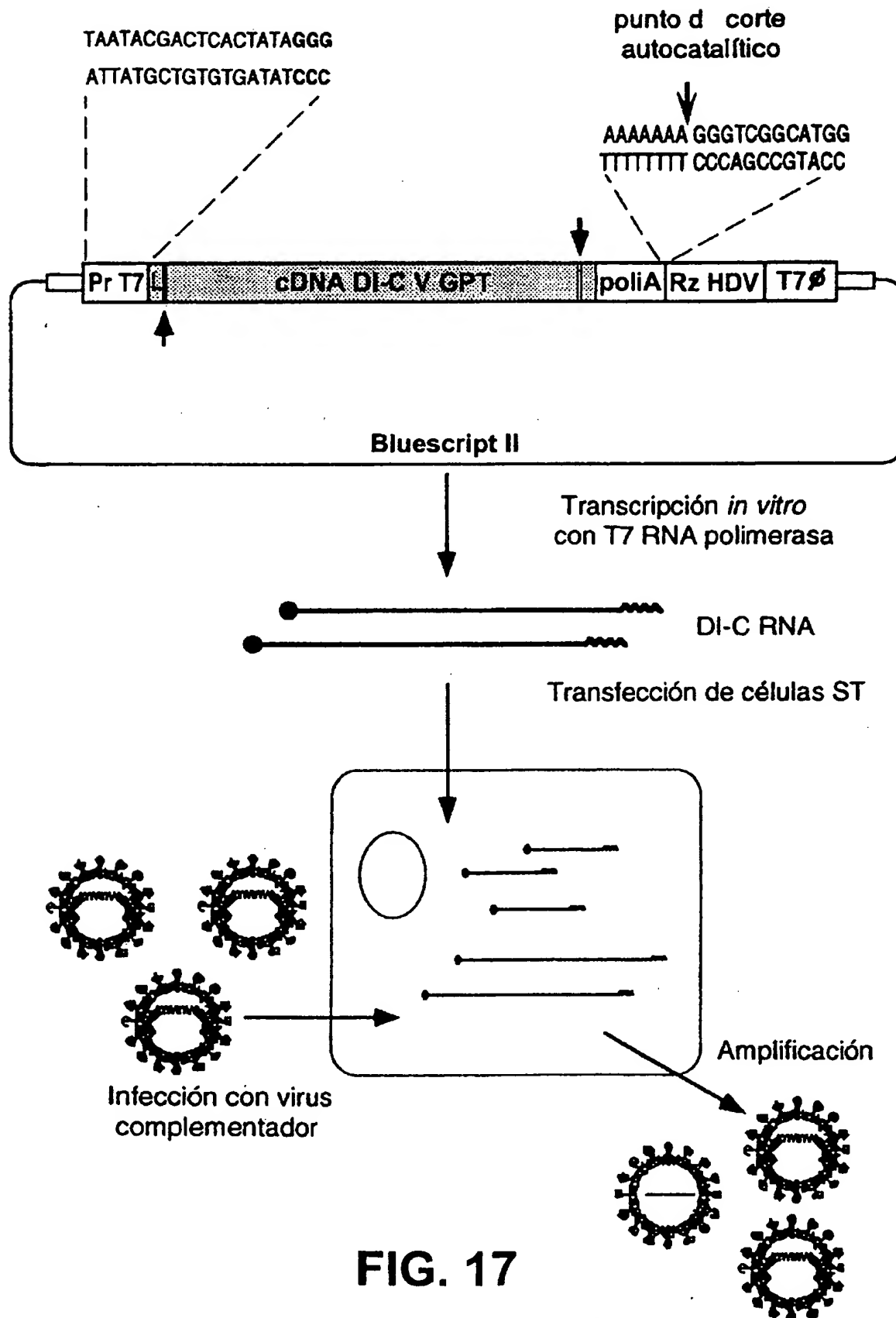


FIG.16

26/27

**FIG. 17**

HOJA DE SUSTITUCION (REGLA 26)

27/27

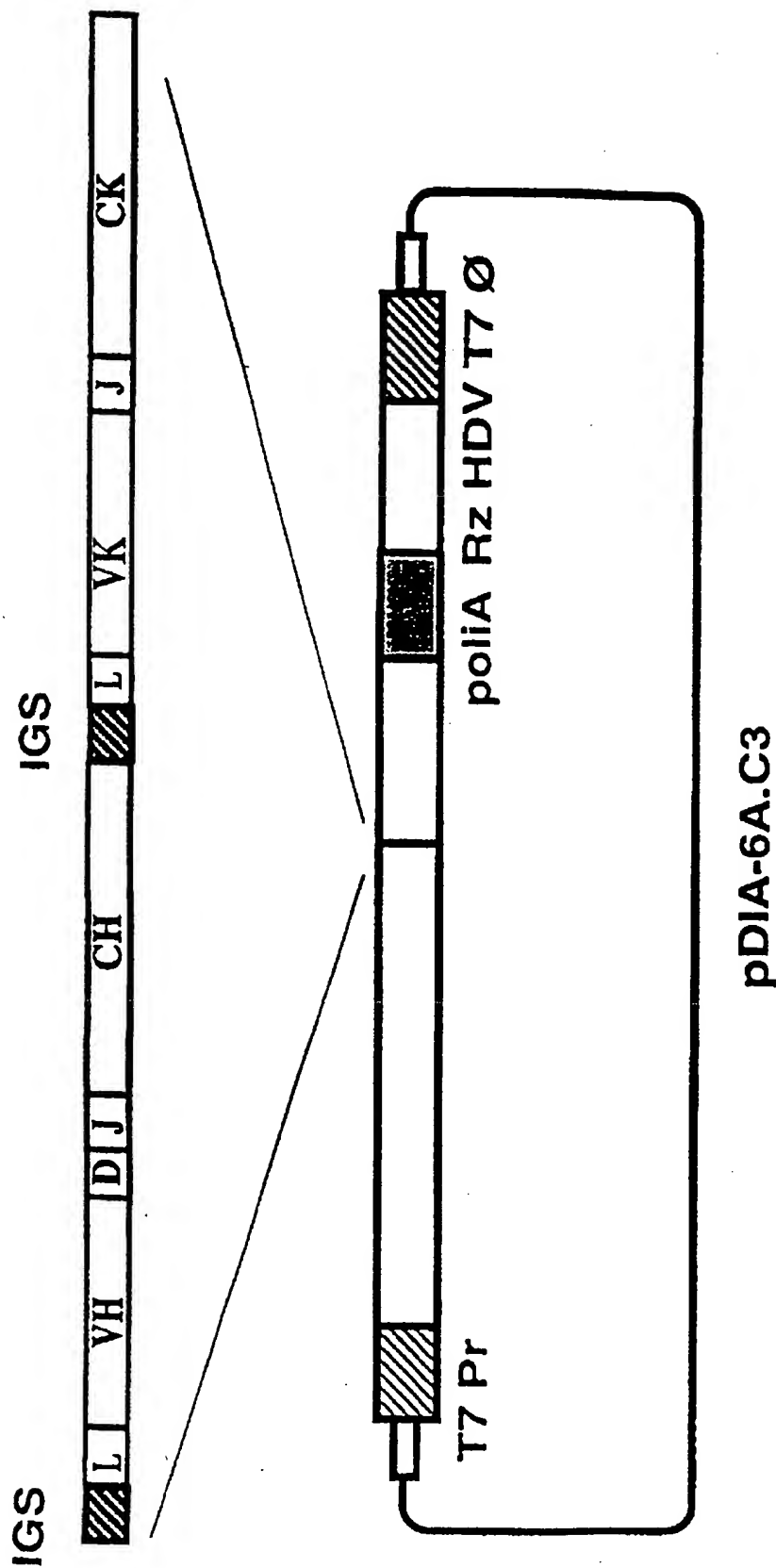


FIG.18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No
PCT/ES 97/00059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K39/225 A61K39/215 A61K35/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|--|
| X | WO 91 03552 A (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 March 1991 | 1,2, 6-12, 14-18, 20-25, 39,40 |
| Y | see page 11, line 17 - page 12, line 17 see page 22, line 10 - page 28, line 7 see page 29, line 30 - page 36, line 6 see page 38, line 1 - page 43, line 35; example 7 --- -/-- | 28, 30-32, 34-36, 38-40,42 |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 1997

Date of mailing of the international search report

31.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/ES 97/00059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|--|
| X | VIROLOGY, vol. 208, no. 1, 1 April 1995, ORLANDO US, pages 319-327, XP002034204 GHING-LEN LIAO: "Coronavirus Defective-Interfering RNA as an expression vector: The generation of a pseudorecombinant Mouse Hepatitis Virus expressing Hemagglutinin-Esterase" | 1-3,6,7, 11, 14-17, 20-24,44 |
| Y | see abstract see page 319, right-hand column, paragraph 2 - page 320, left-hand column, paragraph 2 see page 321, right-hand column, paragraph 3 - page 324, left-hand column, paragraph 1 see page 325, left-hand column, paragraph 1 - page 326, left-hand column, paragraph 2 | 28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45 |
| X | --- ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), 380(CORONA- AND RELATED VIRUSES), 583-9 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002034205 MENDEZ, ANA ET AL: "Structure and encapsidation of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) defective interfering genomes" see abstract see page 585, paragraph 3 - page 588, paragraph 6 | 1,3-6 |
| X | --- J. VIROL. (1991), 65(6), 3219-26 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1991, XP002034206 VAN DER MOST, ROBBERT G. ET AL: "A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs" see abstract see page 3220, right-hand column, last paragraph - page 3225, right-hand column, paragraph 1 --- -/-- | 1,3,6 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No

PCT/ES 97/00059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|--|
| Y | WO 94 17098 A (INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA) 4 August 1994 see page 1, line 17 - page 8, line 7 see page 9, paragraph 12 - page 15, paragraph 19; claims --- | 28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45 |
| A | JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 12, December 1994, pages 8223-8231, XP002034207 RUEY-YI CHANG ET AL.: "A cis-acting function for the Coronavirus leader in defective interfering RNA replication" see abstract see page 8225, right-hand column, last paragraph - page 8230, right-hand column, paragraph 2 --- | 1-45 |
| P,X | VIROLOGY, vol. 217, no. 2, 15 March 1996, ORLANDO US, pages 495-507, XP002034208 ANA MENDEZ ET AL.: "Molecular characterization of transmissible gastroenteritis Coronavirus defective interfering genomes: Packaging and heterogeneity" see abstract see page 498, left-hand column, last paragraph - page 505, right-hand column, paragraph 4 ----- | 1-45 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 97/00059

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9103552 A | 21-03-91 | US 5166057 A | 24-11-92 |
| | | AT 126272 T | 15-08-95 |
| | | AU 636916 B | 13-05-93 |
| | | AU 6411890 A | 08-04-91 |
| | | DE 69021575 D | 14-09-95 |
| | | DE 69021575 T | 14-12-95 |
| | | EP 0490972 A | 24-06-92 |
| | | ES 2075901 T | 16-10-95 |
| | | GR 90100639 A | 30-12-91 |
| | | JP 5500607 T | 12-02-93 |
| | | US 5252289 A | 12-10-93 |
| | | US 5578473 A | 26-11-96 |
| WO 9417098 A | 04-08-94 | ES 2065254 A | 01-02-95 |
| | | ES 2089966 A | 01-10-96 |
| | | AU 7004894 A | 15-08-94 |
| | | CA 2132742 A | 24-07-94 |
| | | EP 0647655 A | 12-04-95 |
| | | NZ 259882 A | 24-03-97 |

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 97/00059

A. CLASIFICACIÓN DE LA INVENCIÓN

CIP 6 C12N15/86 C12N7/01 A61K39/225 A61K39/215 A61K35/76

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 6 C12N C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

| Categoría | Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes | N° de las reivindicaciones pertinentes |
|-----------|---|--|
| X | WO 91 03552 A (THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 21 Marzo 1991 | 1,2, 6-12, 14-18, 20-25, 39,40 |
| Y | ver página 11, línea 17 - página 12, línea 17 ver página 22, línea 10 - página 28, línea 7 ver página 29, línea 30 - página 36, línea 6 ver página 38, línea 1 - página 43, línea 35; ejemplo 7 --- | 28, 30-32, 34-36, 38-40,42 |
| | -/-- | |



En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales



Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

2 Julio 1997

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

31. 07. 97

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Montero Lopez, B

| C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES | | |
|--|--|--|
| Categoría* | Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes | N° de las reivindicaciones pertinentes |
| X | VIROLOGY, vol. 208, num. 1, 1 Abril 1995, ORLANDO US, páginas 319-327, XP002034204 GHING-LEN LIAO: "Coronavirus Defective-Interfering RNA as an expression vector: The generation of a pseudorecombinant Mouse Hepatitis Virus expressing Hemagglutinin-Esterase" | 1-3,6,7, 11, 14-17, 20-24,44 |
| Y | ver resumen ver página 319, columna derecha, párrafo 2 - página 320, columna izquierda, párrafo 2 ver página 321, columna derecha, párrafo 3 - página 324, columna izquierda, párrafo 1 ver página 325, columna izquierda, párrafo 1 - página 326, columna izquierda, párrafo 2 | 28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45 |
| X | --- ADV. EXP. MED. BIOL. (1995), 380(CORONA- AND RELATED VIRUSES), 583-9 CODEN: AEMBAP;ISSN: 0065-2598, 1995, XP002034205 MENDEZ, ANA ET AL: "Structure and encapsidation of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) defective interfering genomes" ver resumen ver página 585, párrafo 3 - página 588, párrafo 6 | 1,3-6 |
| X | --- J. VIROL. (1991), 65(6), 3219-26 CODEN: JOVIAM;ISSN: 0022-538X, 1991, XP002034206 VAN DER MOST, ROBBERT G. ET AL: "A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs" ver resumen ver página 3220, columna derecha, ultimo párrafo - página 3225, columna derecha, párrafo 1 | 1,3,6 |
| Y | --- WO 94 17098 A (INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA) 4 Agosto 1994 ver página 1, línea 17 - página 8, línea 7 ver página 9, párrafo 12 - página 15, párrafo 19; reivindicaciones --- | 28, 30-32, 34-36, 38-40, 42,45 |
| | --- -/-- | |

| C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES | | |
|--|---|--|
| Categoría* | Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes | N° de las reivindicaciones pertinentes |
| A | JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, num. 12, Diciembre 1994, páginas 8223-8231, XP002034207 RUEY-YI CHANG ET AL.: "A cis-acting function for the Coronavirus leader in defective interfering RNA replication" ver resumen ver página 8225, columna derecha, ultimo párrafo - página 8230, columna derecha, párrafo 2 --- | 1-45 |
| P,X | VIROLOGY, vol. 217, num. 2, 15 Marzo 1996, ORLANDO US, páginas 495-507, XP002034208 ANA MENDEZ ET AL.: "Molecular characterization of transmissible gastroenteritis Coronavirus defective interfering genomes: Packaging and heterogeneity" ver resumen ver página 498, columna izquierda, ultimo párrafo - página 505, columna derecha, párrafo 4 ----- | 1-45 |

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 97/00059

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|--|-------------------------|---|-------------------------|
| WO 9103552 A | 21-03-91 | US 5166057 A | 24-11-92 |
| | | AT 126272 T | 15-08-95 |
| | | AU 636916 B | 13-05-93 |
| | | AU 6411890 A | 08-04-91 |
| | | DE 69021575 D | 14-09-95 |
| | | DE 69021575 T | 14-12-95 |
| | | EP 0490972 A | 24-06-92 |
| | | ES 2075901 T | 16-10-95 |
| | | GR 90100639 A | 30-12-91 |
| | | JP 5500607 T | 12-02-93 |
| | | US 5252289 A | 12-10-93 |
| | | US 5578473 A | 26-11-96 |
| WO 9417098 A | 04-08-94 | ES 2065254 A | 01-02-95 |
| | | ES 2089966 A | 01-10-96 |
| | | AU 7004894 A | 15-08-94 |
| | | CA 2132742 A | 24-07-94 |
| | | EP 0647655 A | 12-04-95 |
| | | NZ 259882 A | 24-03-97 |